

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045653**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.12.13

(21) Номер заявки

202090812

(22) Дата подачи заявки

2018.09.20(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)**C07K 16/46** (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**C07K 19/00** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**(54) НОВЫЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ**(31) **PCT/CN2017/103030**(32) **2017.09.22**(33) **CN**(43) **2020.08.07**(86) **PCT/CN2018/106766**(87) **WO 2019/057122 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

УСИ БАЙОЛОДЖИКС АЭЛЭНД**ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:

Сюй Цзяньцин, Ван Чжочжи, Ли Цзин**(CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)(56) **WO-A1-2014014796****CN-A-1561343**WU, X.F. et al. "Protein design of IgG/TCR chimeras for the co-expression of Fab-like moieties within bispecific antibodies", *MABS.*, Vol. 7, No. 2, 22 January 2015 (2015-01-22), pages 364-376**CN-A-1745099****CN-A-1714102****WO-A2-2006054096**SEIMIYA, H. et al. "T cell receptor-extracellular constant regions as hetero-cross-linkers for immunoglobulin variable regions", *J. BIOCHEM.*, Vol. 113, No. 6, 31 December 1993 (1993-12-31), pages 687-691**WO-A1-2017060300****CN-A-107072184**

(57) В изобретении полипептидный комплекс содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антител, соответствующим образом слитые с константными областями TCR. Биспецифический антигенсвязывающий полипептидный комплекс содержит первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент полипептидного комплекса и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент. Способ включает получение полипептидного комплекса или биспецифического антигенсвязывающего полипептидного комплекса. Способ лечения заболевания или нарушения включает применение полипептидного комплекса или биспецифического антигенсвязывающего полипептидного комплекса. Полинуклеотид кодирует полипептидный комплекс и/или биспецифический антигенсвязывающий полипептидный комплекс. Вектор или клетка-хозяин содержит полинуклеотид. Композиция и фармацевтическая композиция содержат полипептидный комплекс и/или биспецифический антигенсвязывающий полипептидный комплекс.

B1**045653****045653****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по международной патентной заявке № PCT/CN2017/103030, поданной 22 сентября 2017 г., содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область изобретения

В целом, настоящее изобретение относится к растворимым полипептидным комплексам, содержащим вариабельные области антитела, слитые с константными областями TCR, и содержащим их биспецифическим полипептидным комплексам.

Уровень техники

Биспецифические антитела становятся новой категорией терапевтических антител. Они могут связываться с двумя разными мишенями или двумя разными эпитопами на мишени, приводя к аддитивному или синергическому эффекту, превосходящему эффект отдельных антител. Предпринято множество попыток конструирования антител для дизайна новых биспецифических форматов, таких как DVD-Ig, CrossMab, ViTE и т.д. (Spiess et al., *Molecular Immunology*, 67(2), pp. 95-106 (2015)). Однако, эти форматы теоретически имеют различные ограничения, касающиеся стабильности, растворимости, небольшого времени полужизни и иммуногенности.

Среди этих форматов биспецифических антител, распространенным форматом является IgG-подобное биспецифическое антитело: одно плечо связывается с мишенью А, а другое плечо связывается с мишенью В. Структурно оно получено из половины антитела А и половины антитела В и имеет размер и форму, схожие с природным IgG. Для облегчения последующей разработки желательно, чтобы такие биспецифические молекулы можно было легко получать, подобно нормальному IgG, из одной клетки-хозяина с высоким уровнем экспрессии и в правильно собранной форме. К сожалению, спаривание когнатных легких и тяжелых цепей, а также сборку двух разных половин антитела невозможно контролировать автоматически. Все типы неправильного спаривания в случайном порядке могут приводить к значительной гетерогенности продукта.

Предпочтительной гетеродимерной сборки двух разных тяжелых цепей достигают посредством встраивания мутаций в Fc-область, таких как "выступы-во-впадины" (Ridgway et al., *Protein Engineering*, 9(7), pp. 617-21(1996); Merchant et al., *Nature Biotechnology*, 16(7), pp. 677-681(1998)), электростатическими способами (Gunasekaran et al., *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), pp. 19637-19646 (2010)) или дизайна "отрицательного состояния" (Kreudenstein et al., *mAbs*, 5(5), pp. 646-654 (2013); Leaver-Fay et al., *Structure*, 24(4), pp. 641-651 (2016)). Однако, селективное спаривание легких и тяжелых цепей каждого отдельного антитела остается затруднительным. Область контакта между легкими и тяжелыми цепями включает вариабельный домен (VH-VL) и константный домен (CH1-CL). Для дизайна ортогональных областей контакта для облегчения когнатного спаривания используют несколько стратегий. Roche поменили местами домены CH1 и CL и создали платформу CrossMab (Schaefer et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), pp. 11187-11192 (2011)), MedImmune включили альтернативную дисульфидную связь (Mazor et al., *mAbs*, 7(2), pp. 377-389 (2015)), Amgen дополнительно улучшали электростатику области CH1-CL (Liu et al., *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), pp.7535-7562 (2015)), и Lilly (Lewis et al., *Nature Biotechnology*, 32(2), pp. 191-198 (2014)) и Genentech (Dillon et al., *mAbs*, 9(2), pp. 213-230 (2017)) включали мутации в вариабельные и константные домены.

Таким образом, в этой области существует потребность в дизайне биспецифических молекул с желаемым уровнем экспрессии и аффинностью к антигенам.

Сущность изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к полипептидному комплексу, содержащему первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) T-клеточного рецептора (TCR), и второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый вариабельный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к биспецифическому полипептидному комплексу, содержащему первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент, связанный со вторым антигенсвязывающим функциональным фрагментом, где первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) T-клеточного рецептора (TCR), и второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый вариабельный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между первым мутантным остатком, содержащимся в C1, и вторым мутантным остатком, содержащимся в C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер, и пер-

вое антитело имеет первую антигенную специфичность, второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент имеет вторую антигенную специфичность, отличающуюся от первой антигенной специфичности, и первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент менее склонны к неправильному спариванию, чем если бы первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты являлись соответствующими частями природного Fab.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к биспецифическому полипептидному комплексу, содержащему первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент, содержащий полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании и имеющий первую антигенную специфичность, связанный со вторым антигенсвязывающим функциональным фрагментом, имеющим вторую антигенную специфичность, отличающуюся от первой антигенной специфичности, и первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент менее склонны к неправильному спариванию, чем если бы первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты являлись соответствующими частями природного Fab.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к биспецифическому фрагменту биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, конъюгированный с функциональным фрагментом.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к выделенному вектору, содержащему полинуклеотид, представленный в настоящем описании.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащему выделенный полинуклеотид, представленный в настоящем описании, или выделенный вектор, представленный в настоящем описании.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу экспрессии полипептидного комплекса, представленный в настоящем описании, или биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, включающему культивирование клетки-хозяина, представленной в настоящем описании, в условиях, в которых экспрессируется полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, включающему а) встраивание в клетку-хозяина первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первым константным доменом (C1) TCR, и второго полинуклеотида, кодирующего второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со вторым константным доменом (C2) TCR, где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между первым мутантным остатком, содержащимся в C1, и вторым мутантным остатком, содержащимся в C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер C1 и C2, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность; б) экспрессию полипептидного комплекса клеткой-хозяином.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, включающему а) встраивание в клетку-хозяина первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) TCR, второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, третий полинуклеотид, кодирующий третий полипептид, содержащий VH второго антитела, и четвертый полинуклеотид, кодирующий четвертый полипептид, содержащий VL второго антитела, где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность, и второе антитело имеет вторую антигенную специфичность; б) экспрессию биспецифического полипептидного комплекса клеткой-хозяином.

В некоторых вариантах осуществления способ получения биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, дополнительно включает выделение полипептидного комплекса.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композиции, содержащей полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержа-

шей полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, включающему введение индивидууму терапевтически эффективного количества полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, или биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления состояние можно облегчать, устранять, лечить или подвергать профилактике в случае модуляции первого антигена и второго антигена.

В некоторых вариантах осуществления ненативная межцепочечная связь образуется между первым мутантным остатком, содержащимся в С1, и вторым мутантным

остатком, содержащимся в С2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого и второго мутантных остатков является остатком цистеина.

В некоторых вариантах осуществления ненативная межцепочечная связь является дисульфидной связью.

В некоторых вариантах осуществления первый мутантный остаток содержится в области контакта С1, и/или второй мутантный остаток содержится в области контакта С2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нативный остаток цистеина отсутствует или присутствует в С1 и/или С2. В некоторых вариантах осуществления нативный остаток цистеина в положении С74 сконструированного С-бета отсутствует или присутствует. В некоторых вариантах осуществления нативный С74 отсутствует в С-бета.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нативный участок N-гликозилирования отсутствует или присутствует в С1 и/или С2. В некоторых вариантах осуществления нативные участки N-гликозилирования отсутствуют в С1 и/или С2.

В некоторых вариантах осуществления димер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более ненативных межцепочечных связей. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из ненативных межцепочечных связей является дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления димер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления а) С1 содержит сконструированную С-бета, и С2 содержит сконструированную С-альфа; б) С1 содержит сконструированную С-альфа, и С2 содержит сконструированную С-бета; в) С1 содержит сконструированную С-бета, и С2 содержит сконструированную С-пре-альфа; д) С1 содержит сконструированную С-пре-альфа, и С2 содержит сконструированную С-бета; е) С1 содержит сконструированную С-гамма, и С2 содержит сконструированную С-дельта; или ф) С1 содержит сконструированную С-дельта, и С2 содержит сконструированную С-гамма.

В некоторых вариантах осуществления первый VH функционально связан с С1 в первом соединительном домене, и первый VL функционально связан с С2 во втором соединительном домене. В некоторых вариантах осуществления первый VH связан с С1 в первом соединительном домене через линкер, первый VL связан с С2 во втором соединительном домене через линкер.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй соединительный домен содержит фрагмент подходящей длины (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков) С-концевого фрагмента соединительной области V/C антитела и фрагмент подходящей длины (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков) N-концевого фрагмента соединительной области V/C TCR.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 9-35, 52-66, 71-86 и 122-127; и/или сконструированная С-альфа содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 6-29, 37-67 и 86-95.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S56C, S16C, F13C, V12C, E14C, L62C, D58C, S76C и R78C, и/или сконструированная С-альфа содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из T49C, Y11C, L13C, S16C, V23C, Y44C, T46C, L51C и S62C.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета и сконструированная С-альфа содержат пару мутантных остатков цистеина, которыми заменяют пару аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S16C в С-бета и Y11C в С-альфа, F13C в С-бета и L13C в С-альфа, S16C в С-бета и L13C в С-альфа, V12C в С-бета и S16C в С-альфа, E14C в С-бета и S16C в С-альфа, F13C в С-бета и V23C в С-альфа, L62C в С-бета и Y44C в С-альфа, D58C в С-бета и T46C в С-альфа, S76C в С-бета и T46C в С-альфа, S56C в С-бета и T49C в С-альфа, S56C в С-бета и L51C в С-альфа, S56C в С-бета и S62C в С-альфа и R78C в С-бета и S62C в С-альфа, и где пара остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нативный участок гликозилирования отсутствует или присутствует в сконструированной С-бета и/или сконструированной С-альфа.

В некоторых вариантах осуществления нативный участок гликозилирования в сконструированной

С-бета представляет собой N69, и/или нативные участки гликозилирования в сконструированной С-альфа выбраны из N34, N68, N79 и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета сохраняет или не сохраняет петлю FG, включающую аминокислотные остатки 101-117 нативной С-бета, и/или петлю DE, включающую аминокислотные остатки 66-71 нативной С-бета.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-альфа содержит любую из SEQ ID NO: 43-48, и/или сконструированная С-бета содержит любую из SEQ ID NO: 33-41 и 306.

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-бета, и С2 содержит сконструированную С-альфа; и где первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 49 или 50, и/или второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 51 или 52.

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-альфа, и С2 содержит сконструированную С-бета; и где первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 129 или 130, и/или второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 49 или 50.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 9-35, 52-66, 71-86 и 122-127; и/или сконструированная С-пре-альфа содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 7-19, 26-34, 56-75 и 103-106.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S16C, A18C, E19C, F13C, A11C, S56C и S76C, и/или сконструированная С-пре-альфа содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S11C, A13C, I16C, S62C, T65C и Y59C.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета и сконструированная С-пре-альфа содержат пару мутантных остатков цистеина, которыми заменяют пару аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S16C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, A18C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, E19C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, F13C в С-бета и A13C в С-пре-альфа, S16C в С-бета и A13C в С-пре-альфа, A11C в С-бета и I16C в С-пре-альфа, S56C в С-бета и S62C в С-пре-альфа, S56C в С-бета и T65C в С-пре-альфа и S76C в С-бет, и Y59C в С-пре-альфа, и где пара мутантных остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нативный участок гликозилирования отсутствует в сконструированной С-бета и/или сконструированной С-пре-альфа.

В некоторых вариантах осуществления отсутствующий или присутствующий участок гликозилирования в сконструированной С-бета представляет собой N69, и/или отсутствующий участок гликозилирования в сконструированной С-пре-альфа представляет собой N50.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета сохраняет или не сохраняет петлю FG, включающую аминокислотные остатки 101-107 нативной С-бета, и/или петлю DE в положении, включающем аминокислотные остатки 66-71 нативной С-бета.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-пре-альфа содержит любую из SEQ ID NO: 82, 83 и 311-318; и/или сконструированная С-бета содержит любую из SEQ ID NO: 84, 33-41 и 319-324.

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-бета, и С2 содержит сконструированную С-пре-альфа; и где первый соединительный домен содержит SEQ ID NO: 49 или 50, и/или второй соединительный домен содержит SEQ ID NO: 81 или 131.

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-пре-альфа, и С2 содержит сконструированную С-бета; и где первый соединительный домен содержит SEQ ID NO: 132 или 133, и/или второй соединительный домен содержит SEQ ID NO: 49 или 50.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-дельта содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 8-26, 43-64 и 84-88; и/или сконструированная С-гамма содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 11-35 и 55-76.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-гамма содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S17C, E20C, F14C, T12C, M62C, Q57C и A19C, и/или сконструированная С-дельта содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из F12C, M14C, N16C, D46C, V50C, F87C и E88C.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-гамма и сконструированная С-дельта содержат пару мутантных остатков цистеина, которыми заменяют пару аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S17C в С-гамма и F12C в С-дельта, E20C в С-гамма и F12C в С-дельта, F14C в С-гамма и M14C в С-дельта, T12C в С-гамма и N16C в С-дельта, M62C в С-гамма и D46C в С-дельта, Q57C в С-гамма и V50C в С-дельта, A19C в С-гамма и F87C в С-дельта и A19C в С-гамма и E88C

в С-дельта, и где встроенная пара остатков цистеина может образовывать межпечочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нативный участок гликозилирования отсутствует или присутствует в сконструированной С-гамма и/или сконструированной С-дельта.

В некоторых вариантах осуществления нативный участок гликозилирования в сконструированной С-гамма представляет собой N65, и/или нативные участки гликозилирования в сконструированной С-дельта представляют собой один или оба из N16 и N79.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-гамма содержит SEQ ID NO: 113, 114, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339 или 340, и/или сконструированная С-дельта содержит SEQ ID NO: 115, 116, 310, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 или 332.

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-гамма, и С2 содержит сконструированную С-дельта; и где первый соединительный домен содержит SEQ ID NO: 117 или 118, и/или второй соединительный домен содержит SEQ ID NO: 119 или 120.

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-дельта, и С2 содержит сконструированную С-гамма; и где первый соединительный домен содержит SEQ ID NO: 123 или 124, и/или второй соединительный домен содержит SEQ ID NO: 125 или 126.

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид дополнительно содержит домен СН2 антитела и/или домен СН3 антитела.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность и вторая антигенная специфичность направлены против двух разных антигенов или направлены против двух разных эпитопов на одном антигене.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CD19. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CD3.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с PD-1. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с PD-1. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления связывание осуществляют посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика, гидрофобно-гидрофильного взаимодействия или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи второго антитела, имеющего вторую антигенную специфичность.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит Fab.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность и вторая антигенная специфичность направлены против двух разных антигенов или направлены против двух разных эпитопов на одном антигене.

В некоторых вариантах осуществления одна из первой и второй антигенных специфичностей направлена против специфической для Т-клеток рецепторной молекулы и/или специфической для естественных киллеров (NK-клеток) рецепторной молекулы, а другая направлена против опухолеассоциированного антигена.

В некоторых вариантах осуществления одна из первой и второй антигенных специфичностей направлена против CD3, а другая направлена против опухолеассоциированного антигена.

В некоторых вариантах осуществления одна из первой и второй антигенных специфичностей направлена против CD3, а другая направлена против CD19.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент дополнительно содержит первый домен димеризации, и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент дополнительно содержит второй домен димеризации, где первый и второй домены димеризации связаны.

В некоторых вариантах осуществления связывание осуществляют посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика, гидрофобно-гидрофильного взаимодействия или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен димеризации содержит по меньшей мере часть шарнирной области антитела, необязательно, полученную из IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен димеризации дополнительно содержит домен димеризации. В некоторых вариантах осуществления домен димеризации содержит по меньшей мере часть шарнирной области антитела, домен СН2 антитела и/или домен СН3 антитела.

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации функционально связан с первой константной областью (C1) TCR в третьем соединительном домене.

В некоторых вариантах осуществления а) C1 содержит сконструированную С-бета, и третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 53 или 54; б) C1 содержит сконструированную С-альфа, и третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 134, 135, 140 или 141; в) C1 содержит сконструированную С-пре-альфа, и третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 134, 135, 140 или 141; д) C1 содержит сконструированную С-гамма, и третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 121 или 122; или е) C1 содержит сконструированную С-дельта, и третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 127 или 128.

В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации функционально связан с переменным доменом тяжелой цепи второго антигенсвязывающего функционального фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации отличаются и связываются таким образом, что препятствуют гомодимеризации и/или способствуют гетеродимеризации.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации могут связываться с образованием гетеродимеров посредством "выступов-во-впадины", гидрофобного взаимодействия, электростатического взаимодействия, гидрофильного взаимодействия или повышенной гибкости.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит первый полипептид, содержащий VH, функционально связанный с химерной константной областью, и второй полипептид содержит VL, функционально связанный с C2, где химерная константная область и C2 содержат пару последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 177/176, 179/178, 184/183, 185/183, 180/176, 181/178, 182/178, 184/186, 185/186, 188/187, 196/187, 190/189, 192/191, 192/193, 195/194, 198/197, 200/199, 202/201, 203/201, 203/204, 205/204, 206/204, 208/207, 208/209, 211/210, 213/212, 213/215, 213/151, 214/212, 214/151, 232/231, 216/215, 218/217, 220/219, 222/221, 224/223, 226/225, 227/223, 229/228, 229/230, 236/235 и 238/237.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность направлена против CD3, и первый полипептид и второй полипептид содержат пару последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/1, 3/4/, 5/1, 6/3, 7/3, 9/8, 10/8, 9/11, 10/11, 13/12, 15/14, 17/16, 17/18, 20/19, 21/12, 65/64, 67/66, 69/68, 70/68, 70/71, 72/71, 73/71, 75/74, 75/76, 78/77, 86/85, 90/89, 91/92/, 94/93, 96/95, 98/97, 99/95, 101/100, 101/102, 106/105, 108/107, 110/109, 112/111, 137/136, 138/136, 137/139 и 138/139.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержат комбинацию четырех последовательностей, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22/12/24/23, 25/12/26/23 и 25/12/27/23, где первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент может связываться с CD3, и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент может связываться с CD19.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно получать в виде Fab, (Fab)₂, битела, тритела, три-Fab, тандемно соединенных Fab, Fab-Fv, тандемно соединенных V-доменов, тандемно соединенных scFv и других форматов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, для детекции, диагностики, прогнозирования или лечения заболевания или состояния.

Указанные выше и другие признаки и преимущества изобретения будут более очевидны из следующего подробного описания нескольких вариантов осуществления со ссылкой на сопутствующие чертежи.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана схема исследуемых форматов антител. Разрабатывали антитело против CD3 T3 и антитело против CD19 U4. Константную область (CL и CH1) T3 заменяли константными доменами TCR для создания уникальной области контакта легкой и тяжелой цепи, ортогональной обычному антителу. TCR-модифицированное T3 и нативное U4 в комбинации с мутациями "выступы-во-впадины" в Fc-домене использовали для дизайна форматов биспецифических антител E17 и F16.

На фиг. 2A-2D показаны наложенные изображения модели антитела Fv и структуры TCR, представляющие собой схему слияния антитела Fv и константной области TCR. На фиг. 2A показана модель структуры антитела Fv, построенная с учетом последовательности антитела против CD3 T3 собственной разработки. На фиг. 2B показана структура TCR из PDB 4L4T. На фиг. 2C показана структурная модель антитела Fv, наложенная на переменную область TCR в разной ориентации. Предварительные химерные белки получали посредством удаления переменного домена TCR при наложении, как показано на фиг. 2D. С помощью перекрывающихся остатков в области соединения конструировали соединительную область. Цепь VL антитела и альфа-цепь TCR указаны белым цветом. Цепь VH и бета-цепь указаны черным цветом.

На фиг. 3A-3B показано сравнение константной области TCR и константной области Fab антитела. На фиг. 3A показана кристаллическая структура TCR из PDB 4L4T. На фиг. 3B показана структурная модель антитела Fab, образованного Fv-доменом модели T3 и константным доменом антитела из PDB 5DK3. Очевидные различия цепей FG и DE в константных доменах TCR и константных доменах антитела Fab отмечены посредством отображения всех боковых цепей остатков.

На фиг. 4 показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS дегликозилированных мутантов химерных антител TCR-антитело с цепями С-альфа и С-бета. Образцы представляли собой все собранные супернатанты после экспрессии в Ехр1293. Дорожки 1, 3, 5, 7 и 9 соответствуют невозстановительным условиям для Дизайн_2-QQQQ, Дизайн_2-AAAA, Дизайн_2-QSKE, Дизайн_2-ASKE и Дизайн_2-QQQQ, соответственно. Дорожки 2, 4, 6, 8 и 10 соответствуют восстановительным условиям.

На фиг. 5 показано дозозависимое связывание при FACS всех дегликозилированных мутантов, связывающихся с CD3-экспрессирующими клетками Jurkat. Все образцы представляли собой собранные супернатанты Ехр1293, экспрессирующих дегликозилированных мутантов. В качестве положительного контроля использовали антитело против CD3 дикого типа (Т3-IgG1).

На фиг. 6А-6В показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS для тестов неправильного спаривания цепей антител Т3 и U4 с изотипами IgG1 (фиг. 6А) и IgG4 (фиг. 6В). Дорожки 1-2 соответствуют парам Т3_легкая-U4_тяжелая и Т3_тяжелая-U4_легкая, соответственно. Дорожки 3-4 имеют тот же порядок пар, что и дорожки 1-2, но с Т3, модифицированным с использованием константной области TCR. Дорожки 1-4 на обеих фигурах соответствуют невозстановленным образцам, и дорожки 5-8 соответствуют восстановленным образцам.

На фиг. 7А-7В показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS очищенного биспецифического антитела E17-Дизайн_2-QQQQ с изотипом IgG1 (фиг. 7А) и IgG4 (фиг. 7В). Изотип IgG1 очищали трехступенчатым способом: хроматография с протеином А, ионообменная хроматография (IEC) и эксклюзионная хроматография (SEC). IgG4 получали посредством двухступенчатой очистки: хроматография с протеином А и SEC. На фиг. 7С-7Д показаны данные SEC-ВЭЖХ для очищенных образцов IgG1 (фиг. 7С) и IgG4 (фиг. 7Д) для определения чистоты образцов.

На фиг. 8 показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS Fab-фрагментов химерного Т3 с меткой 6xHis, очищенных посредством хроматографии с никель-сефарозой Ni Sepharose™ Excel. Дорожки 1 и 3 содержат полосы Т3-Fab-Дизайн_2.his1, и дорожки 2 и 4 содержат полосы Т3-Fab-Дизайн_2.his2.

На фиг. 9 показано дозозависимое связывание при FACS Fab-фрагмента TCR-модифицированного химерного Т3. В качестве положительного контроля использовали моновалентную форму антитела Т3 дикого типа (Т3-Fab-IgG4). В качестве отрицательного контроля использовали обычное антитело IgG4 человека.

На фиг. 10А-10В показано дозозависимое связывание при FACS сконструированного биспецифического антитела E17-Дизайн_2-QQQQ с CD3⁺ клетками Jurkat. Антитела Т3 и U4 дикого типа, а также их моновалентные формы, использовали в качестве положительных контролей (фиг. 10А), а также использовали CD19⁺ клетки Ramos (фиг. 10В). Тестировали изотипы IgG1 и IgG4. В качестве отрицательного контроля использовали неродственное антитело IgG1 или IgG4 человека.

На фиг. 11А-11В показано сравнение связывания при FACS двух сконструированных биспецифических антител, E17-Дизайн_2-QQQQ и F16-Дизайн_2-QQQQ, с CD3 на клетках Jurkat (фиг. 11А) и CD19, экспрессирующимся на клетках Ramos (фиг. 11В). Тестировали биспецифические антитела изотипов IgG1 и IgG4. В качестве отрицательного контроля использовали обычные антитела IgG1 или IgG4 человека.

На фиг. 12 показан анализ цитотоксичности при направляемом Т-клетками цитолизе злокачественных В-клеток, опосредованном сконструированными биспецифическими антителами E17-Дизайн_2-QQQQ изотипов IgG1 и IgG4. В качестве отрицательного контроля использовали родительское моноспецифическое антитело против CD3 (Т3-IgG4) и антитело против CD19 (U4-IgG), а также неродственное антитело IgG1 человека.

На фиг. 13 показано сравнение активности двух сконструированных биспецифических антител, E17-Дизайн_2-QQQQ и F16-Дизайн_2-QQQQ, при опосредовании цитолиза Т-клетками злокачественных В-клеток. В качестве отрицательного контроля использовали неродственное антитело IgG человека.

На фиг. 14А-14В показаны подвергнутые деконволюции массовые спектры биспецифического антитела E17-Дизайн_2-QQQQ в невозстановительных (фиг. 14А) и восстановительных (фиг. 14В) условиях. Пик в 148180,53 на фиг. 14А соответствует правильной молекулярной массе интактного WuXiBody. Пик 22877 Да соответствует легкой цепи, обнаруживаемой на массовых спектрах восстановленных образцов на фиг. 14В. Предполагают, что небольшой пик 149128,45 Да на фиг. 14А соответствует О-гликозилированно (на приблизительно 947,92 Да больше) легкой цепи, показанной на фиг. 14В.

На фиг. 15А-15В показана роль межцепочечной дисульфидной связи при экспрессии антитела с областью контакта альфа/бета, охарактеризованная посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. На фиг. 15А показано антитело, содержащее межцепочечную дисульфидную связь между С-альфа и С-бета; на фиг. 15В показано антитело без межцепочечной дисульфидной связи между С-альфа и С-бета; дорожки 1 и 3 соответствуют результатам электрофореза в ПААГ в невозстановительных условиях для Дизайн_2-QQQQ-IgG4 с встроенной дисульфидной связью и без нее, соответственно. Дорожки 2 и 4 соответствуют результатам электрофореза в ПААГ в восстановительных условиях для Дизайн_2-QQQQ-IgG4 с встроенной дисульфидной связью и без нее, соответственно.

На фиг. 16 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS для сконструированной дисульфидной связи в области контакта пре-альфа/бета. Дорожки 1 и 2 соответствуют "Ди-

зайн_5_Пре_TCR_область соединения" 1_Cys13" и "Дизайн_6_Пре_TCR_область соединения" 1_Cys14", соответственно, в невозстановительных условиях. Дорожки 4 и 5 соответствуют "Дизайн_5_Пре_TCR_область соединения" 1_Cys13" и "Дизайн_6_Пре_TCR_область соединения" 1_Cys14", соответственно, в восстановительных условиях.

На фиг. 17А-17В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS сконструированной дисульфидной связи в области контакта дельта/гамма. Дорожки 6 и 8 соответствуют "Дизайн_2_Cys5_без_гликозилирования" и "Дизайн_2_hupeCys2_без_гликозилирования", соответственно. На фиг. 17А показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS в невозстановительных условиях. На фиг. 17В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS в восстановительных условиях.

На фиг. 18А показана последовательность нативной альфа-цепи TCR и соответствующей ей последовательности с мутантными остатками цистеина. TRAC_человек представляет собой природную последовательность константной области альфа-цепи. 4L4T_Альфа_Кристалл представляет собой последовательность для кристаллической структуры (код PDB 4L4T) с мутациями S55C, которая может образовывать межцепочечную дисульфидную связь. Серая область представляет собой константную область, используемую в настоящем изобретении в качестве остова химерного белка.

На фиг. 18В показана последовательность нативной бета-цепи TCR и соответствующая ей последовательности с мутантными остатками цистеина. TRBC1_человек и TRBC2_человек представляют собой последовательности константной области бета-цепи.

На фиг. 18С показаны последовательности нативной пре-альфа-цепи TCR. PTCRA_человек представляет собой природную последовательность константной области пре-альфа-цепи (пре-альфа-цепь не содержит только вариабельную область). 3OF6_Пре-альфа_Кристалл представляет собой последовательность для кристаллической структуры (код PDB 3OF6). Серая область представляет собой константную область, используемую выше для определения нумерации.

На фиг. 18D показаны последовательности нативной дельта-цепи TCR. TRA@_человек представляет собой природную последовательность константной области дельта-цепи. 4LFH_Дельта_Кристалл представляет собой константную область последовательности дельта-цепи для кристаллической структуры (код PDB 4LFH). Серая область представляет собой константную область, используемую выше для определения нумерации.

На фиг. 18Е показаны последовательности нативной гамма-цепи TCR. TRGC1_человек и TRGC2_человек представляют собой природные последовательности константной области гамма-цепи. 4LFH_Гамма_Кристалл представляет собой константную область последовательности гамма-цепи для кристаллической структуры (код PDB 4LFH). Серая область представляет собой константную область, используемую выше для определения нумерации.

На фиг. 19А-19Е показаны последовательности и нумерация константных областей TCR. На фиг. 19А показаны последовательности и нумерация константной области альфа-цепи TCR. На фиг. 19В показаны последовательности и нумерация константной области бета-цепи TCR. На фиг. 19С показаны последовательности и нумерация константной области пре-альфа-цепи TCR. На фиг. 19D показаны последовательности и нумерация константной области дельта-цепи TCR. На фиг. 19Е показаны последовательности и нумерация константной области гамма-цепи TCR.

На фиг. 20А-20D показаны последовательности и нумерация "выступов-во-впадины" в IgG1 и IgG4. На фиг. 20А показаны последовательности и нумерация мутаций-"выступов" IgG1. На фиг. 20В показаны последовательности и нумерация мутаций-"выступов" IgG4. На фиг. 20С показаны последовательности и нумерация мутаций-"впадин" IgG1. На фиг. 20D показаны последовательности и нумерация мутаций-"впадин" IgG4.

На фиг. 21А-21В показано связывание E17-Дизайн_2-QQQQ в форматах IgG4 (фиг. 21А) и дикого типа IgG1 (фиг. 21В) с C1Q человека по результатам ELISA. В качестве контроля использовали антитело IgG1 человека.

На фиг. 22 показана схема четырех симметричных форматов WuXiBody G19, G19R, G25 и G25R. В случае форматов G19 и G25 два TCR-содержащих химерных Fab-подобных домена пересаживали на С-конец и N-конец нормального антитела, соответственно. Прямоугольниками указаны константные домены TCR, и овалами указаны вариабельные и константные домены антитела. Различием между форматами G19 и G19R или G25 и G25R являются переставленные места нормальный Fab и химерный Fab. Эти форматы могут включать разные вариабельные области из разных пар антител и, как правило, имеют молекулярную массу приблизительно 240-250 кДа.

На фиг. 23А-23В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS (фиг. 23А) и SEC-ВЭЖХ (фиг. 23В) двух очищенных биспецифических антител в формате G19. Номера дорожек на ПААГ соответствуют номерам на фигуре с SEC-ВЭЖХ. Дорожки 1 и 2 соответствуют паре антител T1U6 и U6T1, соответственно. В T1U6 T1 (против CTLA-4) располагали на N-конце формата, в то же время в U6T1 U6 (против PD-1) располагали на N-конце формата. Обе биспецифические молекулы очищали посредством хроматографии с протейном А и достигали чистоты приблизительно 90%.

На фиг. 24А-24В показано дозозависимое связывание при FACS очищенных антител U6T1 и T1U6 в формате G19 со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека (фиг. 24А) и CTLA-4 человека (фиг. 24В). В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 25А-25В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS (фиг. 25А) и SEC-ВЭЖХ (фиг. 25В) очищенных посредством хроматографии с протеином А, биспецифических антител в разных симметричных форматах. Дорожки 1-3 соответствуют паре антител U6T1 в форматах G19R, G25 и G25R, соответственно. РС является контрольным белком с известной молекулярной массой 250 кДа. Все три биспецифические молекулы имели чистоту более 90%. Номера дорожек на ПААГ соответствуют номерам на фигурах с SEC-ВЭЖХ.

На фиг. 26А-26В показано дозозависимое связывание при FACS очищенных биспецифических антител U6T1 в форматах G19R, G25 и G25R со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека (фиг. 26А) и CTLA-4 человека (фиг. 26В). В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4 и PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 27А-27В показаны конкурентные анализы FACS сконструированных биспецифических антител в форматах G19R, G25 и G25R для блокирования связывания PD-L1 человека с PD-1 (фиг. 27А) и связывания CD80 с CTLA-4 (фиг. 27В), соответственно. В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4 и PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 28А-28В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS (фиг. 28А) и SEC-ВЭЖХ (фиг. 28В) очищенных посредством хроматографии с протеином А, биспецифических антител в разных симметричных форматах. Дорожки 1-4 соответствуют паре антител U6T5 в форматах G19, G19R, G25 и G25R, соответственно. РС является контрольным белком с молекулярной массой 250 кДа. Все три биспецифические молекулы имели чистоту более 90%. Номера дорожек на ПААГ соответствуют номерам на фигурах с SEC-ВЭЖХ.

На фиг. 29А-29В показано дозозависимое связывание при FACS очищенных биспецифических антител в форматах G19, G19R, G25 и G25R со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека (фиг. 29А) и CTLA-4 человека (фиг. 29В). В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4×PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 30 показан анализ двойного связывания ELISA для двух молекул U6T5.G25 и U6T1.G25R. В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4×PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 31А-31В показаны конкурентные анализы FACS сконструированных биспецифических антител U6T5.G25 и U6T1.G25R блокирует связывание PD-L1 человека PD-1 (фиг. 31А) и связывание CD80 с CTLA-4 (фиг. 31В), соответственно. В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4×PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 32 показана схема трех симметричных форматов G26, G27 и G26R с переставленными местами химерными Fab-подобными доменами в легких и тяжелых цепях.

На фиг. 33А-33В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS (фиг. 33А) и SEC-ВЭЖХ (фиг. 33В) очищенных посредством хроматографии с протеином А, биспецифических антител в форматах G27 и G26R. Дорожки 1-2 соответствуют паре антител T4U6 в форматах G27 и G26R, соответственно. Только в случае формата G26R достигали чистоты 90% после очистки. Номера дорожек на ПААГ соответствуют номерам на фигурах с SEC-ВЭЖХ.

На фиг. 34А-34В показано дозозависимое связывание при FACS очищенной биспецифической пары антител T4U6 в формате G26R со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека (фиг. 34А) и CTLA-4 человека (фиг. 34В). В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4×PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 35А-35В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS (фиг. 35А) и SEC-ВЭЖХ (фиг. 35В) очищенной посредством хроматографии с протеином А, биспецифической пары антител U6T4 в формате G26. Достигали чистоты 90% после очистки.

На фиг. 36А-36D показано дозозависимое связывание при ELISA очищенной биспецифической пары антител U6T4 в формате G26 со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека (фиг. 36А) и CTLA-4 человека (фиг. 36В), а также дозозависимое связывание при FACS очищенной биспецифической пары антител U6T4 в формате G26 со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека (фиг. 36С) и CTLA-4 человека (фиг. 36D). В качестве контроля использовали демонстрационное биспецифическое антитело против CTAL-4×PD-1 (BMK1.IgG1) и в качестве отрицательного контроля использовали неродственное антитело IgG4.

На фиг. 37 показаны гистограммы проточной цитометрии линии клеток WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9, трансфицированной с использованием CD19 яванского макака, и родительской линии клеток CHO-K1.

На фиг. 38 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP. М: белковый маркер; дорожка 1: W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP, невозстановительные условия; дорожка 3: W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP, восстановительные условия.

На фиг. 39 показана SEC-ВЭЖХ W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.

На фиг. 40 показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP. М: белковый маркер; Lane1: W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP, невозстановительные условия; Lane2: W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP, восстановительные условия.

На фиг. 41 показана SEC-ВЭЖХ W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP.

На фиг. 42А-42В показано связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с клетками Ramos (фиг. 42А) и клетками Jurkat (фиг. 42В) по результатам FACS.

На фиг. 43А-43В показано связывание W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP с клетками Ramos (фиг. 43А) и клетками Jurkat (фиг. 43В) по результатам FACS.

На фиг. 44 показано связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с клетками, экспрессирующим CD19 яванского макака, по результатам FACS.

На фиг. 45 показано связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с CD3 яванского макака по результатам ELISA.

На фиг. 46А-46В показана аффинность W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP к CD19 и CD3 человека, измеряемая по связыванию с клетками Ramos (фиг. 46А) и Jurkat (фиг. 46В).

На фиг. 47А-47В показано опосредованное W3438-T3U4.E17-LuIgG4.SP связывание CD3⁺ клеток с CD19⁺ клетками (фиг. 47А). В качестве отрицательного контроля использовали неродственный IgG (фиг. 47В).

На фиг. 48А-48В показана цитотоксическая активность опосредованного W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP цитолиза клеток Raji Т-клетками (фиг. 48А) и цитотоксическая активность опосредованного W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP цитолиза клеток Raji Т-клетками (фиг. 48В).

На фиг. 49А-49D показана экспрессия CD69 и CD25 на Т-клетках в присутствии или отсутствие CD19⁺ клеток-мишеней. Процентная доля CD69⁺ Т-клеток в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток (фиг. 49А); процентная доля CD69-экспрессирующих Т-клеток в субпопуляции CD8⁺ Т-клеток (фиг. 49В); процентная доля CD25-экспрессирующих Т-клеток в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток (фиг. 49С); процентная доля CD25-экспрессирующих Т-клеток в субпопуляции CD8⁺ Т-клеток (фиг. 49D).

На фиг. 50А-50D показано высвобождение цитокинов ИФН γ и ФНО α Т-клетками в присутствии или отсутствие CD19⁺ клеток-мишеней. Высвобождение ИФН γ в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток (фиг. 50А); высвобождение ФНО α в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток (фиг. 50В); высвобождение ИФН γ в субпопуляции CD8⁺ Т-клетка (фиг. 50С); высвобождение ФНО α в субпопуляции CD8⁺ Т-клетка (фиг. 50D).

На фиг. 51А-51В показана стабильность W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP в сыворотке человека. Связывание образцов W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP, инкубируемых в сыворотке, с клетками Ramos в указанные дни (фиг. 51А); связывание образцов W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP, инкубируемых в сыворотке, с клетками Jurkat в указанные дни (фиг. 51В).

На фиг. 52 показано связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с C1Q по результатам ELISA. В качестве контроля использовали антитело IgG1.

На фиг. 53 показан объем опухоли после введения гуманизированным мышам, несущим ксенотрансплантаты опухолей Raji, W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP в разных дозах с примешанными РВМС. Точки данных соответствуют среднему в группе, и планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего (SEM). В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 54 показана фармакокинетика W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP у яванского макака. Образцы сыворотки двух яванских макаков анализировали посредством ELISA.

На фиг. 55А-55В показано антитело против лекарственного средства (ADA, определяемое посредством ELISA) в образцах сыворотки обезьяны #1 (фиг. 55А) и обезьяны #2 (фиг. 55В), включая моменты до и после введения W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP.

На фиг. 56А-56В показан электрофорез в ПААГ в присутствии SDS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP. М: белковый маркер. РС: биспецифическое антитело положительного контроля с массой приблизительно 250 кДа (фиг. 56А), и SEC-ВЭЖХ W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP (фиг. 56В).

На фиг. 57 показаны температуры плавления W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP, W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и демонстрационного биспецифического антитела против CTLA-4 \times PD-1 WBP324-BMK1.uIgG1.KDL.

На фиг. 58 показано связывание при FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1 человека. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL, W324-BMK2.uIgG4 и W324-BMK3.uIgG4 представляют собой разные версии демонстрационных биспецифических антител против CTLA-4 и PD-1. WBP305-BMK1.IgG4 является антителом против PD-1. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 59 показано связывание при FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP со сконструированными клетками, экспрессирующим PD-1 яванского макака. WBP305_1.153.7.hAb и WBP305-BMK1.IgG4 являются антителами против PD-1. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 60 показано связывание при FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP со сконструированными клетками, экспрессирующими CTLA-4 человека. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL, W324-BMK2.uIgG4 и W324-BMK3.uIgG4 являются разными демонстрационными биспецифическими антителами против CTLA-4×PD-1. WBP316-BMK1.IgG4 является антителом против CTLA-4-1. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 61 показано связывание при FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP со сконструированными клетками, экспрессирующими CTLA-4 яванского макака. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL является демонстрационным биспецифическим антителом против CTLA-4 и PD-1. W3162_1.154.8-z35-IgG1K и WBP316-BMK1.IgG4 являются антителами против CTLA-4. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 62 показаны аффинности связывания W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP с CTLA-4 и PD-1, измеряемые посредством SPR. WBP316-BMK1.IgG4 является антителом против CTLA-4-1. В качестве контроля использовали родительское антитело против PD-1.

На фиг. 63 показаны FACS конкурентные анализы W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP для блокирования связывания белка PD-L1 человека со сконструированными клетками, экспрессирующими PD-1. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL является демонстрационным биспецифическим антителом против CTLA-4×PD-1. WBP3055_1.153.7.hAb и WBP305-BMK1.IgG4 являются антителами против PD-1. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 64 показаны конкурентные анализы FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP для блокирования связывания белка CTLA-4 человека со сконструированными клетками, экспрессирующими CD80. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL является демонстрационным биспецифическим антителом против CTLA-4×PD-1. W3162_1.154.8-z35-IgG1K и WBP316-BMK1.IgG4 являются антителами против CTLA-4. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 65 показаны конкурентные анализы FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP для блокирования связывания белка CTLA-4 яванского макака со сконструированными клетками, экспрессирующими CD80. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL является демонстрационным биспецифическим антителом против CTLA-4×PD-1. W3162_1.154.8-z35-IgG1K и WBP316-BMK1.IgG4 являются антителами против CTLA-4. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 66 показан анализ двойного связывания ELISA W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP. WBP324-BMK1.uIgG1.KDL является демонстрационным биспецифическим антителом против CTLA-4×PD-1. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 67 показано двойное связывание при FACS W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP с CTLA-4 и PD-1. В качестве отрицательного контроля использовали антитело IgG4.

На фиг. 68A-68B показана стабильность W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP в сыворотке в течение 14 дней, измеряемая посредством анализа двойного связывания ELISA с CTLA-4 и PD-1 человека (фиг. 68A), и стабильность W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP в сыворотке в течение 14 дней, измеряемая посредством анализа двойного связывания ELISA с CTLA-4 и PD-1 человека (фиг. 68B).

Подробное описание изобретения

Следующее описание изобретения представлено исключительно для иллюстрирования различных вариантов его осуществления. В связи с этим, конкретные описываемые модификации не следует истолковывать как ограничение объема изобретения. Специалисту в этой области очевидно, что можно осуществлять различные эквиваленты, изменения и модификации без отклонения от объема изобретения, и следует понимать, что такие эквивалентные варианты осуществления следует включать в настоящее изобретение. Все цитируемые в настоящем описании ссылки, включая публикации, патенты и патентные заявки, включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Определения.

В настоящем описании термины в единственном числе используют для обозначения одного или более (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера, термин "полипептидный комплекс" означает один полипептидный комплекс или более полипептидных комплексов.

В рамках изобретения термин "приблизительно" относится к количеству, уровню, значению, числу, частоте, процентной доле, размеру, массе или длине, отклоняющихся на вплоть до 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от референсного количества, уровня, значения, числа, частоты, процентной доли, размера, массы или длины. В конкретных вариантах осуществления термин "приблизительно", предшествующий числовому значению, означает значение плюс или минус диапазон 15%, 10%, 5% или 1%.

На всем протяжении настоящего описания, если контекст не требует иного, термины "содержат", "содержит" и "содержащий" следует понимать как означающие включение указанной стадии, или элементов, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии, или элемента, или группы стадий или элементов. Термин "состоящий из" означает включающий все, что следует после фразы "состоящий из", и ограниченный этим. Таким образом, фраза "состоящий из" указывает, что указанные элементы являются обязательными, и что другие элементы не могут присутствовать. Термин "со-

стоящий, по существу, из" означает включающий любые элементы, указанные после фразы, и ограниченный другими элементами, не препятствующими активности или действию, приведенных в описании в отношении указанных элементов, или не вносящими вклад в активность или действие. Таким образом, фраза "стоящий, по существу, из" означает, что указанные элементы являются обязательными, но другие элементы являются необязательными и могут присутствовать или отсутствовать в зависимости от того, влияют ли они на активность или действие указанных элементов.

На всем протяжении настоящего описания ссылка на "один из вариантов осуществления", "вариант осуществления", "конкретный вариант осуществления", "родственный вариант осуществления", "некоторый вариант осуществления" или "дополнительный вариант осуществления изобретения" или их комбинации означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в отношении варианта осуществления, включены по меньшей мере в один из вариантов осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление указанных выше фраз в различных местах на всем протяжении настоящего описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики можно комбинировать любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления.

В настоящем описании термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков или совокупности множества полимеров аминокислотных остатков. Термины относятся к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственным химическим миметиком соответствующей природной аминокислоты, а также к полимерам природных аминокислот и полимерам неприродных аминокислот. Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, функционирующим схожим образом с природными аминокислотами. Природные аминокислоты являются аминокислотами, кодируемыми генетическим кодом, а также аминокислотами, модифицированными впоследствии, например, гидроксипролином, гамма-карбоксихлутаматом и О-фосфосерином. Термин "аналоги аминокислот" относится к соединениям, имеющим ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е. альфа-атом углерода, связанный с атомом водорода, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, гомосеринон, норлейцинон, сульфоксиду метионина, метилметионинсульфонию. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Термин "альфа-атом углерода" относится к первому атому углерода, присоединенному к функциональной группе, такой как карбонил. Термин "бета-атом углерода" относится ко второму атому углерода, соединенному с альфа-атомом углерода, и нумерацию атомов углерода продолжают в алфавитном порядке с использованием букв греческого алфавита. Термин "миметики аминокислот" относится к химическим соединениям, имеющим структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но функционирующим схожим образом с природной аминокислотой. Термин "белок", как правило, относится к крупным полипептидам. Термин "пептид", как правило, относится к коротким полипептидам. Полипептидные последовательности, как правило, описывают таким образом, что левый конец полипептидной последовательности представляет собой амино-конец (N-конец), а правый конец полипептидной последовательности представляет собой карбокси-конец (C-конец). В рамках изобретения термин "полипептидный комплекс" относится к комплексу, содержащему один или более полипептидов, связанных для осуществления некоторых функций. В некоторых вариантах осуществления полипептиды ассоциированы с иммунной системой.

В рамках изобретения термин "антитело" включает любой иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, полиспецифическое антитело или биспецифическое (бивалентное) антитело, связывающееся с конкретным антигеном. Нативное интактное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области ("HCVR") и первой, второй и третьей константной области (CH1, CH2 и CH3), в то время как каждая легкая цепь состоит из варибельной области ("LCVR") и константной области (CL). Тяжелые цепи млекопитающих классифицируют как α , δ , ϵ , γ и μ , и легкие цепи млекопитающих классифицируют как λ или κ . Антитело имеет "Y"-образную форму, при этом стебель Y состоит из второй и третьей константных областей двух тяжелых цепей, соединенных дисульфидной связью. Каждое плечо Y включает варибельную область и первую константную область одной тяжелой цепи, соединенные с варибельной и константной областями одной легкой цепи. Варибельные области легких и тяжелых цепей отвечают за связывание антигена. Варибельные области в обеих цепях, как правило, содержат три высоковарибельные петли, названные определяющими комплементарность областями (CDR) (CDR легкой цепи (L) включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, CDR тяжелой цепи (H) включают HCDR1, HCDR2, HCDR3). Границы CDR антител можно определять или идентифицировать по Kabat, Chothia или Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol. Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28; 342 (6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., National Institute of Health, Bethesda, Md.(1991)). Три CDR распределены среди тяжелой, известных как каркасные области (FR), являющихся более консервативными, чем CDR, и образующих каркас для поддержки гиперварибельных петель. Каждая HCVR и LCVR содержит четыре FR, и CDR и

FR расположены от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Константные области тяжелых и легких цепей не участвуют в связывании антигена, но выполняют различные эффекторные функции. Антитела распределяют по классам с учетом аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи. Пятью основными классами или изотипами антител являются IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, отличающиеся наличием тяжелых цепей α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Несколько основных классов антител разделяют на подклассы, такие как IgG1 (тяжелая цепь γ 1), IgG2 (тяжелая цепь γ 2), IgG3 (тяжелая цепь γ 3), IgG4 (тяжелая цепь γ 4), IgA1 (тяжелая цепь α 1) или IgA2 (тяжелая цепь α 2).

В рамках изобретения термин "вариабельный домен" в отношении антитела относится к вариабельной области антитела или ее фрагменту, содержащему одну или более CDR. Хотя вариабельный домен может содержать интактную вариабельную область (такую как HCVR или LCVR), она также может содержать вариабельную область меньше интактной, но при этом сохранять способность связываться с антигеном или образовывать антигенсвязывающий участок.

В рамках изобретения термин "антигенсвязывающий функциональный фрагмент" относится к фрагменту антитела, образованному частью антитела, содержащей одну или более CDR, или любому другому фрагменту антитела, связывающемуся с антигеном, но несодержащему интактную нативную структуру антитела. Неограничивающие примеры антигенсвязывающего функционального фрагмента включают вариабельный домен, вариабельную область, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидной связью (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидной связью диатело (ds-диатело), полиспецифическое антитело, камелизированное однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело и бивалентное доменное антитело. Антигенсвязывающий функциональный фрагмент может связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий функциональный фрагмент может содержать одну или более CDR из конкретного антитела человека, пересаженных на каркасную область одного или более разных антител человека. Более подробно форматы антигенсвязывающих функциональных фрагментов описаны в Spiess et al., 2015 (выше), и Brinkman et al., mAbs, 9(2), pp. 182-212 (2017), включенных в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Термин "Fab" в отношении антитела относится к части антитела, состоящей из одной легкой цепи (вариабельной и константной областей), соединенной с вариабельной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления константные области легкой цепи и тяжелой цепи заменяют константными областями TCR.

Термин "Fab" относится к Fab-фрагменту, включающему часть шарнирной области.

Термин "F(ab')₂" относится к димеру Fab'.

Термин "битело" относится к слитому белку, образованному посредством слияния scFv с C-концом легкой цепи (Fab-L-scFv) или Fd (Fab-H-scFv).

Термин "тритело" относится к слитому белку, образованному посредством слияния scFv с легкой цепью и тяжелой цепью (Fab-(scFv)₂).

"WuXiBody" является биспецифическим антителом, содержащим растворимый химерный белок с вариабельными доменами антитела и константными доменами TCR, где субъединицы (такие как альфа- и бета-домены) константных доменов TCR соединяют посредством сконструированной дисульфидной связи.

Термин "Fd-фрагмент" в отношении антитела относится к аминоконцевой половине фрагмента тяжелой цепи, который можно комбинировать с легкой цепью для получения Fab.

Термин "Fc" в отношении антитела относится к части антитела, состоящей из второй (CH2) и третьей (CH3) константных областей первой тяжелой цепи, связанным со второй и третьей константными областями второй тяжелой цепи посредством дисульфидной связи. Fc-часть антитела отвечает за различные эффекторные функции, такие как ADCC и CDC, но не участвует в связывании антигена.

Термин "шарнирная область" в отношении антитела включает часть молекулы тяжелой цепи, соединяющую домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 аминокислотных остатков и является гибкой, таким образом, позволяя двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо.

В рамках изобретения термин "домен CH2" относится к части молекулы тяжелой цепи, пролегающей, например, приблизительно от аминокислоты 244 до аминокислоты 360 антитела IgG при использовании общепринятых схем нумерации (аминокислоты 244-360 по системе нумерации Kabat и аминокислоты 231-340 по системе нумерации EU; см. Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)).

"Домен CH3" пролегает от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 аминокислот. Некоторые классы иммуноглобулинов, например, IgM, дополнительно включают область CH4.

Термин "Fv" в отношении антитела относится к наименьшему фрагменту антитела, несущему полный антигенсвязывающий участок. Fv-фрагмент состоит из вариабельного домена одной легкой цепи,

соединенного с вариабельным доменом одной тяжелой цепи. Разработан ряд форматов Fv, включая dsFv, в котором соединение между двумя доменами усилено встроенной дисульфидной связью; и scFv можно получать с использованием пептидного линкера для связывания двух доменов в виде единого полипептида. Также получают конструкции Fv, содержащие вариабельный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, соединенный с вариабельным и константным доменом соответствующей тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина. Fv также тримеризуют для получения диател и триател (Maunard et al., *Annu Rev Biomed Eng* 2 339-376 (2000)).

Термин "ScFab" относится к слитому полипептиду с Fd, соединенным с легкой цепью через полипептидный линкер, что приводит к образованию одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab).

Термин "три-Fab" относится к тривалентному, биспецифическому слитому белку, состоящему из трех единиц с Fab-функциональностью. Три-Fab несут два обычных Fab, слитых с асимметричным Fab-подобным функциональным фрагментом.

Термин "Fab-Fab" относится к слитому белку, полученному посредством слияния Fd-цепи первого плеча Fab с N-концом Fd-цепи второго плеча Fab.

Термин "Fab-Fv" относится к слитому белку, полученному посредством слияния HCVR с C-концом Fd-цепи и LCVR с C-концом легкой цепи. Молекулу "Fab-dsFv" можно получать посредством встраивания междоменной дисульфидной связи между доменом HCVR и доменом LCVR.

Термин "mAb-Fv" или "IgG-Fv" относится к слитому белку, полученному посредством слияния домена HCVR с C-концом одной Fc-цепи и доменом LCVR, экспрессируемым отдельно или слитым с C-концом другой Fc-цепи, что приводит к получению биспецифического, тривалентного слитого белка IgG-Fv (mAb-Fv), при этом Fv стабилизируют посредством междоменной дисульфидной связи.

Термины "ScFab-Fc-scFv₂" и "ScFab-Fc-scFv" относятся к слитому белку, полученному посредством слияния одноцепочечного Fab с Fc и стабилизированными дисульфидной связью Fv-доменами.

Термин "добавленный IgG" относится к слитому белку с плечом Fab, слитым с IgG для получения формата биспецифического (Fab)₂-Fc. Оно может образовывать "IgG-Fab" или "Fab-IgG" с Fab, слитым с C-концом или N-концом молекулы IgG с линкером или без него. В некоторых вариантах осуществления "добавленный IgG" можно дополнительно модифицировать в формат IgG-Fab₄ (см. Brinkman et al., 2017, выше).

Термин "DVD-Ig" относится к антителу с двойным вариабельным доменом, получаемому посредством слияния дополнительного домена HCVR и домена LCVR со второй специфичностью с тяжелой цепью и легкой цепью IgG. Термин "CODV-Ig" относится к родственному формату, в котором два домена HCVR и два домена LCVR таким образом, что происходит перекрестное спаривание вариабельных доменов HCVR-LCVR, расположенных (с N-конца к C-концу) в порядке HCVRA-HCVRB и LCVRB-LCVRA или в порядке HCVRB-HCVRA и LCVRA-LCVRB.

Термин "CrossMab" относится к технологии спаривания немодифицированной легкой цепи с соответствующей немодифицированной тяжелой цепью и спаривания модифицированной легкой цепи с соответствующей модифицированной тяжелой цепью для получения антитела со сниженным неправильным спариванием в легкой цепи.

"ViTE" представляет собой привлекающий T-клетки биспецифический активатор, содержащий первый scFv с первой антигенной специфичностью в ориентации LCVR-HCVR, соединенный со вторым scFv со второй специфичностью в ориентации HCVR-LCVR.

Термин "процент (%) идентичности последовательности" в отношении аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) определяют как процент остатков аминокислот (или нуклеотидов) в последовательности-кандидате, являющихся идентичными остаткам аминокислот (или нуклеотидов) в референсной последовательности после выравнивания последовательностей и, при необходимости, включения пропусков для достижения максимального количества идентичных аминокислот (или нуклеотидов). Консервативную замену аминокислотных остатков можно считать или не считать идентичным остатком. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) можно осуществлять, например, с использованием общедоступных инструментов, таких как программное обеспечение BLASTN, BLASTp (доступные на веб-сайте U.S. National Center for Biotechnology Information (NCBI), также см. Altschul S.F. et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Stephen F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)), ClustalW2 (доступное на веб-сайте European Bioinformatics Institute, также см. Higgins D.G. et al., *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21): 2947-8 (2007)) и ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в этой области могут использовать параметры по умолчанию такого инструмента или, при необходимости, могут подбирать параметры выравнивания, например, выбирая подходящий алгоритм.

В рамках изобретения термин "антиген" или "Ag" относится к соединению, композиции, пептиду, полипептиду, белку или веществу, которое может стимулировать продукцию антител или T-клеточный ответ в культуре клеток или у животного, включая композиции (такие как композиция, включающая опухолеспецифический белок), добавляемые к культуре клеток (такой как гибридома), или инъецируемые животному, или абсорбируемые животным. Антиген реагирует с продуктами специфического гумо-

рального или клеточного иммунитета (такими как антитело), включая продукты, индуцируемые гетерологичными антигенами.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к области антигена, с которым связывается связывающее средство (такое как антитело). Эпитопы могут образовываться из смежных аминокислот (линейный или последовательный эпитоп) или несмежных аминокислот, сближающихся при фолдинге третичной структуры белка (конфигурационный или конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, расположены линейно вдоль аминокислотных остатков первичной структуры белка, и небольшие сегменты смежных аминокислот могут расщепляться при связывании антигена с использованием молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) или сохраняться при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные при фолдинге третичной структуры, как правило, утрачиваются после обработки денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, и, более типично, по меньшей мере 5, приблизительно 7 или приблизительно 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

В рамках изобретения термин "специфическое связывание" или "специфически связывается" относится к неслучайной реакции связывания между двумя молекулами, такими как, например, антитело и антиген. В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс и биспецифический полипептидный комплекс, представленные в настоящем описании, специфически связываются с антигеном с аффинностью связывания (K_D) $\leq 10^{-6}$ М (например, $\leq 5 \times 10^{-7}$ М, $\leq 2 \times 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 5 \times 10^{-8}$ М, $\leq 2 \times 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, $\leq 2 \times 10^{-9}$ М, $\leq 10^{-9}$ М или $\leq 10^{-10}$ М). В рамках изобретения термин " K_D " относится к отношению скорости диссоциации и скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), ее можно определять способами поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием такого устройства, как Biacore.

Термин "функциональная связь" или "функционально связанный" относится к сближению двух или более интересующих биологических последовательностей с использованием спейсера или линкера или без них таким образом, что они находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать надлежащим образом. При использовании в отношении полипептидов термин означает, что полипептидные последовательности соединяют таким образом, что соединенный продукт может иметь заданную биологическую функцию. Например, варибельную область антитела можно функционально связывать с константной областью для получения стабильного продукта с антигенсвязывающей активностью. Термин также можно использовать в отношении полинуклеотидов. В качестве одного из примеров, если полинуклеотид, кодирующий полипептид, функционально связан с регуляторной последовательностью (например, промотором, энхансером, сайленсером и т.д.), термин означает, что полинуклеотидные последовательности соединяют таким образом, что возможна регулируемая экспрессия полипептида с полинуклеотида.

При использовании в отношении аминокислотных последовательностей (например, пептида, полипептида или белка) термин "слияние" или "слитый" относится к комбинированию двух или более аминокислотных последовательностей, например посредством химического связывания или рекомбинантными способами, в одну аминокислотную последовательность, несуществующую в природе. Слитую аминокислотную последовательность можно получать посредством генетической рекомбинации двух кодирующих полинуклеотидных последовательностей и экспрессировать ее посредством встраивания конструкции, содержащей рекомбинантные полинуклеотиды, в клетку-хозяина.

В рамках изобретения термин "спейсер" относится к искусственной аминокислотной последовательности, содержащей 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков или длиной от 5 до 15, 20, 30, 50 или более аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями и используемых для соединения одного или более полипептидов. Спейсер может иметь или не иметь вторичную структуру. В этой области известны последовательности спейсеров, см., например, Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Poljak et al. Structure 2:1121-1123 (1994). Можно использовать любые подходящие спейсеры, известные в этой области. Например, спейсер, который можно использовать в настоящем изобретении, может быть богат остатками глицина и пролина. Примеры включают спейсеры, имеющие одну или повторяющиеся последовательности, состоящие из треонина/серина и глицина, такие как TGGGG (SEQ ID NO: 266), GGGGS (SEQ ID NO: 267) или SGGGG (SEQ ID NO: 268) или их тандемные повторы (например, 2, 3, 4 или более повторов). Альтернативно, спейсер может являться длинной пептидной цепью, содержащей один или более последовательных или тандемных повторов аминокислотной последовательности GAPGGGGGAAAAGGGGG (SEQ ID NO: 269). В определенном варианте осуществления спейсер содержит 1, 2, 3, 4 или более последовательных или тандемных повторов SEQ ID NO: 269.

Термин "антигенная специфичность" относится к конкретному антигену или его эпитопу, селективно распознаваемому антигенсвязывающей молекулой.

В рамках изобретения термин "замена" в отношении аминокислотного остатка относится к природной или индуцированной замене одной или более аминокислот другой аминокислотой в пептиде, полипептиде или белке. Замена в полипептиде может приводить к снижению, повышению или устранению функции полипептида.

Замена также может являться "консервативной заменой", что в отношении аминокислотной после-

довательности относится к замене аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со схожими физико-химическими свойствами, или замене аминокислот, не являющихся критичными для активности полипептида. Например, консервативные замены можно осуществлять среди аминокислотных остатков с неполярными боковыми цепями (например, Met, Ala, Val, Leu и Ile, Pro, Phe, Trp), остатков с незаряженными полярными боковыми цепями (например, Cys, Ser, Thr, Asn, Gly и Gln), остатков с кислыми боковыми цепями (например, Asp, Glu), аминокислот с основными боковыми цепями (например, His, Lys и Arg), аминокислот с бета-разветвленными боковыми цепями (например, Thr, Val и Ile), аминокислот с серосодержащими боковыми цепями (например, Cys и Met) или остатков с ароматическими боковыми цепями (например, Trp, Tyr, His и Phe). В некоторых вариантах осуществления замены, делеции или добавления тоже можно считать "консервативными заменами". Количество аминокислот, подвергаемых inserции или делеции, может находиться в диапазоне приблизительно от 1 до 5. Как правило, консервативная замена не вызывает значительного изменения конформационной структуры белка, и, таким образом, белок может сохранять биологическую активность.

В рамках изобретения термин "мутация" или "мутантный" в отношении аминокислотного остатка относится к замене, inserции или добавлению аминокислотного остатка.

В рамках изобретения термин "гомологичная последовательность" относится к полинуклеотидным последовательностям (или их комплементарным цепям) или аминокислотным последовательностям, имеющим идентичность последовательности по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) в отношении других последовательностей, необязательно, при выравнивании.

В рамках изобретения термин "Т-клетка" относится к типу лимфоцита, играющему ключевую роль в клеточном иммунитете, включая хелперные Т-клетки (например, CD4⁺ Т-клетки, Т-хелперы 1 типа, Т-хелперы 2 типа, Т-хелперы 3 типа, Т-хелперы 17 типа), цитотоксические Т-клетки (например, CD8⁺ Т-клетки), Т-клетки памяти (например, Т-клетки центральной памяти (ТСМ-клетки), Т-клетки эффектор-памяти (ТЕМ-клетки и ТЕМРА-клетки) и резидентные Т-клетки памяти (ТМ), являющиеся CD8⁺ или CD4⁺), НКТ-клетки и ингибиторные Т-клетки.

Нативный "Т-клеточный рецептор" или нативный "TCR" является гетеродимерным белком на поверхности Т-клетки, связывающимся с инвариантными цепями CD3 с образованием комплекса, способного опосредовать передачу сигнала. TCR принадлежит к супер семейству иммуноглобулинов и похож на половину антитела с одной тяжелой цепью и одной легкой цепью. Нативный TCR имеет внеклеточную часть, трансмембранную часть и внутриклеточную часть. Внеклеточный домен TCR содержит проксимальную к мембране константную область и дистальную к мембране переменную область.

В рамках изобретения термины "индивидуум", или "животное", или "пациент" относятся к человеку или не являющегося человеком животному, включая млекопитающего или примата, нуждающегося в диагностике, прогнозировании, улучшении, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения. Млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, и животных, содержащихся в зоопарках, спортивных животных или животных-питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, свиньи, коровы, медведи и т.д.

А. Полипептидный комплекс.

Настоящее изобретение относится к новым полипептидным комплексам, содержащим переменный домен тяжелой цепи антитела, функционально связанный с первой константной областью Т-клеточного рецептора (TCR), и переменный домен легкой цепи антитела, функционально связанный со второй константной областью TCR, где первая константная область TCR и вторая константная область TCR соединены по меньшей мере одной ненативной межцепочечной связью. Полипептидный комплекс содержит по меньшей мере две полипептидные цепи, каждая из которых содержит переменный домен, полученный из антитела, и константную область, полученную из TCR. Две полипептидные цепи полипептидных комплексов содержат пару из переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, функционально связанную с парой константных областей TCR, соответственно. Примеры пар константных областей TCR включают, например, константные области TCR альфа/бета, пре-альфа/бета и гамма/дельта. Константные области TCR в полипептидных комплексах, представленных в настоящем описании, могут являться полноразмерными областями или фрагментами и могут быть сконструированы при условии, что пара константных областей TCR может связываться друг с другом с образованием димера.

Неожиданно обнаружили, что полипептидные комплексы, представленные в настоящем описании, по меньшей мере с одной ненативной межцепочечной связью (в частности, ненативной дисульфидной связью) могут рекомбинантно экспрессироваться и собираться в желаемой конформации, стабилизирующей димер константных областей TCR, обеспечивая хорошую антигенсвязывающую активность переменных областей антитела. Кроме того, обнаружили, что полипептидные комплексы хорошо переносят общепринятое конструирование антител, например, модификацию участков гликозилирования и удаление некоторых природных последовательностей. Кроме того, полипептидные комплексы, представленные в настоящем описании, можно включать в биспецифический формат, который легко может экспрессироваться и собираться с минимальным неправильным спариванием антигенсвязывающих после-

довательностей или без него благодаря наличию в полипептидных комплексах константных областей TCR. Дополнительные преимущества полипептидных комплексов и конструкций, представленных в настоящем описании, станут более очевидными из представленного ниже описания.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к полипептидным комплексам, содержащим первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) T-клеточного рецептора (TCR), и второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где: C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность.

i. Константная область TCR.

Полипептидные комплексы, представленные в настоящем описании, содержат константные области, полученные из TCR.

Нативный TCR состоит из двух полипептидных цепей и, в основном, имеет два типа: один состоит из альфа- и бета-цепей (т.е. TCR альфа/бета), а другой состоит из гамма- и дельта-цепей (т.е. TCR гамма/дельта). Эти два типа структурно схожи, но имеют разную локализацию и функции. Приблизительно 95% T-клеток человека имеют TCR альфа/бета, в то время как остальные 5% имеют TCR гамма/дельта. Также обнаруживают предшественника альфа-цепи, и он назван пре-альфа-цепь. Каждая из двух полипептидных цепей TCR содержит иммуноглобулиновый домен и проксимальную к мембране область. Иммуноглобулиновая область содержит переменную область и константную область и отличается наличием укладки иммуноглобулинового типа. Каждая полипептидная цепь TCR содержит остаток цистеина (например, на C-конце константного домена или N-конце проксимальной к мембране области), который вместе с соответствующим остатком может образовывать дисульфидную связь, соединяющую две цепи TCR.

На фиг. 18A-18E приведены аминокислотные последовательности нативных константных областей альфа-, пре-альфа-, бета-, гамма- и дельта-цепей TCR. Для ясности, каждый из аминокислотных остатков в этих последовательностях пронумерован на фиг. 19A-19E, и такую нумерацию используют на всем протяжении настоящего описания для обозначения конкретного аминокислотного остатка в конкретной константной области TCR.

Константная область альфа-цепи TCR человека известна как TRAC с регистрационным номером NCBI P01848 или аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 254.

Константная область бета-цепи человека TCR имеет два разных варианта, известных как TRBC1 и TRBC2 (номенклатура IMGT), при этом соответствующие последовательности приведены как SEQ ID NO: 256 и SEQ ID NO: 257, соответственно (также см. Toyonaga B, et al., PNAS, Vol. 82, pp. 8624-8628, Immunology (1985)). Эти два константных домена бета-цепи отличаются 4-м, 5-м и 37-м аминокислотными остатками экзона 1. В частности, TRBC1 содержит 4N, 5K и 37F в экзоне 1, и TRBC2 содержит 4K, 5N и 37Y в экзоне 1.

В частности, нативная бета-цепь TCR содержит нативный остаток цистеина в положении 74 (см. фиг. 19B), являющийся неспаренным и, таким образом, необразующим дисульфидную связь в нативном TCR альфа/бета. В некоторых вариантах осуществления этот нативный остаток цистеина отсутствует в полипептидных комплексах, представленных в настоящем описании, или подвергнут мутации в другой остаток. Это может быть полезным во избежание неправильного внутрицепочечного или межцепочечного спаривания. В некоторых вариантах осуществления нативный остаток цистеина заменяют другим остатком, например, серином или аланином. В некоторых вариантах осуществления замена может улучшить эффективность рефолдинга TCR *in vitro*.

Константные области гамма-цепи TCR человека имеют два варианта, известные как TRGC1 и TRGC2 (см. Lefranc et al., Eur. J. Immunol. 19:989-994 (1989)) с регистрационными номерами NCBI A26659 и P03986, соответственно, или аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 263 и SEQ ID NO: 265, соответственно.

Константная область дельта-цепи TCR человека известна как TRDC с регистрационным номером NCBI A35591 или аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 261.

Константную область TCR в полипептидных комплексах, представленных в настоящем описании, также можно получать из антигенного рецептора пре-T-клеток (пре-TCR). Пре-TCR экспрессируется незрелыми тимоцитами, играющими ключевую роль в раннем развитии T-клеток. Пре-TCR имеет обычную бета-цепь, но специальную пре-альфа-цепь только с константной областью, последовательность и структура которой отличаются от обычной альфа-цепи (см. Harald von Boehmer, Nat Rev Immunol, Jul; 5(7):571-7 (2005)). Последовательность константной области пре-альфа-цепи человека (PTCRA) имеет регистрационный номер NCBI AAF89556.1 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 259.

В рамках изобретения первая и вторая константные области TCR полипептидных комплексов, представленных в настоящем описании, могут образовывать димер между константными областями TCR, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь, которая может стабилизи-

ровать димер.

В рамках изобретения термин "димер" относится к связанной структуре, образованной двумя молекулами, такими как полипептиды или белки, посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий. Гомодимер образован двумя идентичными молекулами, и гетеродимер образован двумя разными молекулами. Димер, образованный первой и второй константными областями TCR, является гетеродимером.

Межцепочечная связь образуется между одним аминокислотным остатком на одной константной области TCR и другим аминокислотным остатком на другой константной области TCR. В некоторых вариантах осуществления ненативная межцепочечная связь может являться любой цепью или взаимодействием, посредством которого можно соединять две константные области TCR в димер. Примеры подходящей ненативной межцепочечной связи включают дисульфидную связь, водородную связь, электростатическое взаимодействие, соляной мостик или гидрофобно-гидрофильное взаимодействие, "выступы-во-впадины" или их комбинацию.

Термин "дисульфидная связь" относится к ковалентной связи со структурой R-S-S-R'. Аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь со второй тиоловой группой, например другого остатка цистеина. Дисульфидная связь может образовываться между тиоловыми группами двух остатков цистеина, находящихся, соответственно, на двух полипептидных цепях, таким образом, образующих межцепочечный мостик или межцепочечную связь.

Электростатическое взаимодействие является нековалентным взаимодействием, важно для фолдинга, стабильности, гибкости и функции белка и включает ионные взаимодействия, водородную связь и галогенную связь. Электростатическое взаимодействие может происходить в полипептиде, например, между Lys и Asp, между Lys и Glu, между Glu и Arg или между Glu, Trp на первой цепи и Arg, Val или Thr на второй цепи.

Соляной мостик является электростатическим взаимодействием ближнего диапазона, в основном, возникающим между анионом карбоксилата Asp или Glu и катионом аммония Lys или гуанидиния Arg, являющихся пространственно проксимальными парами противоположно заряженных остатков в нативных белковых структурах. Заряженные и полярные остатки в, главным образом, гидрофобных областях контакта могут действовать в качестве "горячих точек" для связывания. Среди прочих, остатки с ионизируемыми боковыми цепями, такие как His, Tyr и Ser, HYPERLINK также могут участвовать в образовании солевого мостика.

Гидрофобное взаимодействие может происходить между одним или более из Val, Tyr и Ala на первой цепи и одним или более из Val, Leu и Trp на второй цепи или His и Ala на первой цепи и Thr и Phe на второй цепи (см. Brinkmann, et al., 2017, выше).

Водородная связь образуется посредством электростатического притяжения между двумя полярными группами, когда атом водорода ковалентно связан с высоко электроотрицательным атомом, таким как азот, кислород или фтор. Водородная связь может образовываться в полипептиде между атомами кислорода остова (например, халькогенными группами) и атомами водорода амида (азот-содержащей группы) двух остатков, соответственно, такими как азот-содержащая группа в Asn и кислородсодержащая группа в His, или кислород-содержащая группа в Asn и азот-содержащая группа в Lys. Водородная связь сильнее вандерваальсова взаимодействия, но слабее ковалентной или ионной связи и является ключевой для поддержания вторичной структуры и третичной структуры. Например, альфа-спираль образуется, когда аминокислотные остатки расположены равномерно между положениями i и $i+4$, и бета-лист является тяжем пептидной цепи длиной 3-10 аминокислот, образующимся, когда два пептида, соединенные по меньшей мере двумя или тремя водородными связями остова, образуют скрученный, складчатый лист.

В рамках изобретения термин "выступы-во-впадины" относится к взаимодействию между двумя полипептидами, где один полипептид имеет выпуклость (т.е. "выступ") благодаря наличию аминокислотного остатка, имеющего объемную боковую цепь (например, тирозин или триптофан), а другой полипептид имеет полость (т.е. "впадину"), где находится аминокислотный остаток с небольшой боковой цепью (например, аланин или треонин), и выпуклость располагается в полости таким образом, что способствует взаимодействию двух полипептидов с образованием гетеродимера или комплекса. В этой области известны способы получения полипептидов с "выступами-во-впадины", например, как описано в патенте США № 5731168.

В некоторых вариантах осуществления димер константных областей TCR содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ненативных межцепочечных связей. Необязательно, по меньшей мере одна из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ненативных межцепочечных связей является дисульфидной связью, водородной связью, электростатическим взаимодействием, соляным мостиком, гидрофобно-гидрофильным взаимодействием или любой их комбинацией.

В рамках изобретения термин "ненативная" межцепочечная связь относится к межцепочечной связи, необнаруживаемой при нативном соединении соответствующих нативных константных областей TCR. Например, ненативная межцепочечная связь может образовываться между мутантным аминокислотным остатком и нативным аминокислотным остатком, каждый из которых находится в соответст-

вующей константной области TCR; или, альтернативно, между двумя мутантными аминокислотными остатками, находящимися в соответствующих константных областях TCR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна ненативная межцепочечная связь образуется между первым мутантным остатком, содержащимся в первой константной области TCR, и вторым мутантным остатком, содержащимся во второй константной области TCR полипептидного комплекса.

Термин "мутантный" аминокислотный остаток относится к остатку, представляющему собой замену, инсерцию или добавление и отличающемуся от соответствующего нативного остатка в соответствующей нативной константной области TCR. Например, если аминокислотный остаток в конкретном положении константной области TCR дикого типа обозначают как "нативный" остаток, то соответствующий ему мутантный остаток является любым остатком, отличающимся от нативного остатка, но находящимся в том же положении константной области TCR. Мутантный остаток может являться иным остатком, которым заменяют нативный остаток в том же положении или который встраивают перед нативным остатком, и, таким образом, он занимает его исходное положение.

В некоторых вариантах осуществления мутантный остаток может являться природным аминокислотным остатком. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого и второго ненативных аминокислотных остатков является мутантным остатком цистеина. В некоторых вариантах осуществления одна или более из ненативных межцепочечных связей является дисульфидной связью. В некоторых вариантах осуществления ненативная дисульфидная связь может образовываться между двумя мутантными остатками цистеина, содержащимися в первой и второй константных областях TCR, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого и второго мутантных остатков является неприродным аминокислотным остатком. Термин "неприродный аминокислотный остаток" относится к аминокислотному остатку, обнаруживаемому в природе в белках человека, но который может экспрессироваться с помощью кодона нуклеиновой кислоты, который можно встраивать в кодирующий полинуклеотид. Например, неприродная аминокислота, такая как L-3,4-дигидроксифенилаланин (L-DOPA), может реагировать и перекрестно сшиваться с природными аминокислотами, такими как цистеин, гистидин и лизин, при периодат-индуцированном окислении. Показано, что при встраивании L-DOPA в антитело неприродная аминокислота могла эффективно перекрестно сшиваться с остатками на антигене, что приводит к образованию ковалентно связанного комплекса антитело-антиген (Xu, J. et al., 2014, Structure-based non-canonical amino acid design to covalently crosslink antibody-antigen complex. *Journal of Structural Biology*, 185(2), pp. 215-222). В настоящем описании предусмотрено, что мутантный аминокислотный остаток в первой и/или второй константных областях TCR может содержать неприродный аминокислотный остаток, такой как L-DOPA, который может перекрестно сшиваться с природным аминокислотным остатком (или, альтернативно, неприродным аминокислотным остатком) с образованием ненативной межцепочечной ковалентной связи.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна ненативная дисульфидная связь образуется между мутантным остатком цистеина и нативным остатком цистеина. В некоторых вариантах осуществления ненативные дисульфидные связи образуются между двумя мутантными остатками цистеина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из остатков цистеина, образующих ненативную дисульфидную связь, является мутантным остатком цистеина. В некоторых вариантах осуществления оба остатка цистеина, образующих ненативную дисульфидную связь являются мутантными остатками цистеина на первой и второй константных областях TCR, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первую и/или вторую константные области TCR можно конструировать так, чтобы они содержали один или более мутантных аминокислотных остатков, отвечающих за образование ненативной межцепочечной связи. Для встраивания такого мутантного остатка в константную область TCR можно воздействовать на кодирующую последовательность области TCR, например, для замены кодона, кодирующего нативный остаток, кодоном, кодирующим мутантный остаток, или для инсерции кодона, кодирующего мутантный остаток, перед кодоном нативного остатка. В константную область TCR можно встраивать один или более желаемых мутантных аминокислотных остатков, например, один или более аминокислотных остатков (например, остатков цистеина), способных образовывать дисульфидную связь, которые могут приводить к электростатическим взаимодействиям между двумя константными областями TCR, которые могут повышать гибкость константных областей TCR, которые могут способствовать расположению по меньшей мере одной аминокислоты, образующей ковалентную связь, такую как водородная связь, вдали от константного домена TCR, которые могут участвовать в образовании солевого мостика; гидрофобных аминокислотных остатков, которые могут приводить к гидрофобным взаимодействиям; и гидрофильных аминокислотных остатков, которые могут приводить к гидрофильным взаимодействиям, и т.д.

В некоторых вариантах осуществления первую и/или вторую константные области TCR можно конструировать так, чтобы они содержали один или более мутантных остатков цистеина. Например, остаток не-цистеина можно заменить остатком цистеина, или остаток цистеина можно встраивать между двумя исходно смежными нативными остатками не-цистеина. Положения замены можно определять таким образом, что после замены остатками цистеина может образовываться ненативная межцепочечная

дисульфидная связь между двумя константными областями TCR. В связи с этим, можно учитывать множество факторов, например, остатки цистеина, образующие дисульфидную связь, могут находиться достаточно близко друг к другу, могут иметь подходящую ориентацию связи альфа-бета, тиоловые группы остатков цистеина могут быть ориентированы друг к другу, остаток, подлежащий замене, может иметь боковую цепь с химическими свойствами, относительно схожими с боковой цепью остатка цистеина, и/или замена не будет значительно менять третичную структуру константной области TCR или самого полипептидного комплекса.

Специалист в этой области может определять расстояние и угол между двумя аминокислотными остатками, подлежащими замене, подходящими известными в этой области способами, в качестве неограничивающих примеров, расстояние определяют посредством фотодетектирования, компьютерного моделирования, ЯМР-спектроскопии или рентгеновской кристаллографии. В иллюстративном примере в случае интересующего полипептида (такого как константная область TCR) его белковую кристаллическую структуру можно получать в общедоступных базах данных, таких как база данных PDB, или, альтернативно, выявлять такими способами, как рентгеновская кристаллография. Для определения расстояний и углов между аминокислотными остатками с учетом данных о белковой кристаллической структуре можно использовать подходящее компьютерное программное обеспечение. В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, дисульфидная связь может образовываться между мутантными остатками цистеина, имеющими достаточно близко расположенные соответствующие бета-атому углерода, например, с расстоянием менее 8 ангстрем, 7 ангстрем, 6 ангстрем, 5 ангстрем, 4 ангстрем, 3 ангстрем, 2 ангстрем, 1 ангстрем или менее, если комплекс правильно свернут.

Дополнительные подходящие положения для конструирования в первой и/или второй константных областях TCR можно получать из данных о кристаллической структуре, опубликованных для комплекса между TCR альфа и бета (Boulter, J.M. et al., *Protein engineering*, 16(9), pp.707-711 (2003)) или гамма и дельта (Allison, T.J. et al., *Nature*, 411(6839), pp. 820-824 (2001); Uldrich, A.P. et al., *Nature Immunology*, 14(11), pp. 1137-1145 (2013)). После определения остатка, подлежащего замене, специалист легко может определять встроенный кодон, подлежащий мутации (например, посредством выравнивания последовательностей с использованием существующего программного обеспечения, такого как ClustalW (веб-сайт European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk/index.html))), а затем подвергать его мутагенезу в кодон для цистеина известными в этой области способами, такими как ПЦР-мутагенез.

Образование межцепочечной дисульфидной связи можно определять подходящими, известными в этой области способами. Например, экспрессируемый белковый продукт можно подвергать электрофорезу в ПААГ в присутствии SDS в восстановительных и невосстановительных условиях, соответственно, с последующим сравнением полученных полос для идентификации потенциальных различий, свидетельствующих о наличии межцепочечной дисульфидной связи.

Ненативная межцепочечная связь может стабилизировать полипептидный комплекс. Такие эффекты стабилизации можно воплощать различными способами. Например, наличие мутантного аминокислотного остатка или ненативная межцепочечная связь могут позволить полипептидному комплексу стабильно экспрессироваться, и/или экспрессироваться на высоком уровне, и/или соединиться в стабильный комплекс, имеющий желаемую биологическую активность (например, антигенсвязывающую активность), и/или экспрессироваться на высоком уровне и собираться в желаемый стабильный комплекс, имеющий желаемую биологическую активность. Способность межцепочечной связи стабилизировать первую и вторую константные области TCR можно оценивать подходящими, известными в этой области способами, например, по молекулярной массе, определяемой посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, или термостабильности, измеряемой посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) или дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). В иллюстративном примере образование стабильного полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, можно подтверждать посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, если продукт демонстрирует молекулярную массу, сравнимую с комбинированной молекулярной массой первого и второго полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, является стабильным в том смысле, что его термостабильность составляет не менее 50%, 60%, 70%, 80% или 90% термостабильности природного Fab. В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, является стабильным в том смысле, что его термостабильность сравнима с термостабильностью природного Fab.

Не желая быть связанной какой-либо теорией, полагают, что ненативная межцепочечная связь (такая как дисульфидная связь), образованная между первой и второй константными областями TCR в полипептидных комплексах, может стабилизировать гетеродимер константных областей TCR, таким образом, повышая уровень правильного фолдинга, структурную стабильность и/или уровень экспрессии гетеродимера и полипептидных комплексов. В отличие от нативного TCR, закоренного в мембране поверхности Т-клетки, обнаружено, что гетеродимеры нативных внеклеточных доменов TCR являются гораздо менее стабильными, несмотря на их сходство с антителом Fab по трехмерной структуре. Фактически, нестабильность нативного TCR в растворимом состоянии являлась значительным препятствием для

определения его кристаллической структуры (см. Wang, Protein Cell, 5(9), pp. 649-652(2014)). Встраивая пару цистеиновых (Cys) мутаций в константных областях TCR и, таким образом, делая возможным образование межцепочечной ненативной дисульфидной связи, можно стабильно экспрессировать полипептидные комплексы, в то же время сохраняя антигенсвязывающую способность варибельной области антигена.

Константную область TCR, содержащую мутантный остаток, в настоящем описании также обозначают как "сконструированную" константную область TCR. В некоторых вариантах осуществления первая константная область TCR (C1) полипептидного комплекса содержит сконструированную альфа-цепь TCR (С-альфа), и вторая константная область TCR (C2) содержит сконструированную бета-цепь TCR (С-бета). В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-бета, и C2 содержит сконструированную С-альфа. В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную пре-альфа-цепь TCR (С-пре-альфа), и C2 содержит сконструированную С-бета. В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-бета, и C2 содержит сконструированную С-пре-альфа. В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную гамма-цепь TCR (С-гамма), и C2 содержит сконструированную дельта-цепь TCR (С-дельта). В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-дельта, и C2 содержит сконструированную С-гамма.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная константная область TCR содержит один или более мутантных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления один или более мутантных остатков содержатся в области контакта первой и/или второй сконструированных константных областей TCR.

В рамках изобретения термин "область контакта" относится к конкретным областям на полипептидах, в которых полипептиды взаимодействуют/соединяются друг с другом. Область контакта содержит один или более аминокислотных остатков, способных взаимодействовать с соответствующими аминокислотными остатками, контактирующими или соединяющимися, когда происходит взаимодействие. Аминокислотные остатки в области контакта могут находиться или не находиться в непрерывной последовательности. Например, если область контакта является трехмерной, аминокислотные остатки в области контакта могут быть разделены по разным положениям в линейной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 9-35, 52-66, 71-86 и 122-127. В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-альфа содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 6-29, 37-67 и 86-95. Если не указано иначе, нумерация аминокислотных остатков в константной области TCR по настоящему изобретению является такой, как представлено на фиг. 19А-19Е.

В некоторых вариантах осуществления одна или более дисульфидных связей могут образовываться между сконструированной С-альфа и сконструированной С-бета. Мутантный остаток цистеина в С-бета может представлять собой замену, выбранную из группы, состоящей из S56C, S16C, F13C, V12C, E14C, F13C, L62C, D58C, S76C и R78C, и/или мутантные остатки цистеина в С-альфа могут представлять собой замену, выбранную из группы, состоящей из T49C, Y11C, L13C, S16C, V23C, Y44C, T46C, L51C и S62C. В некоторых вариантах осуществления пара мутантных остатков цистеина может представлять собой пару замен, выбранных из группы, состоящей из S16C в С-бета и Y11C в С-альфа, F13C в С-бета и L13C в С-альфа, S16C в С-бета и L13C в С-альфа, V12C в С-бета и S16C в С-альфа, E14C в С-бета и S16C в С-альфа, F13C в С-бета и V23C в С-альфа, L62C в С-бета и Y44C в С-альфа, D58C в С-бета и T46C в С-альфа, S76C в С-бета и T46C в С-альфа, S56C в С-бета и T49C в С-альфа, S56C в С-бета и L51C в С-альфа, S56C в С-бета и S62C в С-альфа и R78C в С-бета и S62C в С-альфа, и где пара остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь.

В рамках изобретения на всем протяжении настоящей заявки термин "XnY" в отношении константной области TCR предназначен для обозначения того, что n-й аминокислотный остаток X в константной области TCR (с учетом нумерации на фиг. 19А-19Е, как представлено в настоящем описании) заменяют аминокислотным остатком Y, где X и Y, соответственно, представляют собой однобуквенное обозначение конкретного аминокислотного остатка. Следует отметить, что число n основано исключительно на нумерации, представленной на фиг. 19А-19Е, и оно может отличаться от его точного положения. В качестве иллюстративного примера используют последовательность С-бета (S56C) (N69Q), приведенную в SEQ ID NO: 34. Хотя замена S на C находится в 48-м остатке в SEQ ID NO: 34, сам остаток обозначают как 56-ой остаток с учетом системы нумерации на фиг. 19А-19Е, и, таким образом, замену S на C обозначают как S56C, а не S48C. Аналогично, замену N на Q также обозначают как N69Q с учетом системы нумерации на фиг. 19А-19Е. Если не указано иначе, это правило обозначения замен аминокислотных остатков используют по отношению ко всей константной области TCR в настоящем описании. Аналогично, термин "XnY" при использовании в отношении Fc-области предназначен для обозначения того, что n-й аминокислотный остаток X в константной области Fc (с учетом нумерации на фиг. 20А-20D, как представлено в настоящем описании) заменяют аминокислотным остатком Y.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит или представляет собой любую из SEQ ID NO: 33-41, и сконструированная С-альфа содержит или представляет собой любую

из SEQ ID NO: 43-48.

В некоторых вариантах осуществления одна или более ненативных дисульфидных связей могут образовываться в областях контакта между С-пре-альфа и С-бета. В некоторых вариантах осуществления область контакта на С-пре-альфа выбрана из замен в положении аминокислотных остатков 7-19, 26-34, 56-75 и 103-106. В некоторых вариантах осуществления область контакта на С-бета выбрана из замен в положении аминокислотных остатков 9-35, 52-66, 71-86 и 122-127.

В некоторых вариантах осуществления одна или более дисульфидных связей могут образовываться между сконструированной константной областью альфа-цепи пре-TCR (С-пре-альфа) и константной областью бета-цепи (С-бета). Мутантные остатки цистеина в С-бета могут представлять собой замену, выбранную из группы, состоящей из S16C, A18C, E19C, F13C, A11C, S56C и S76C, и/или мутантные остатки цистеина в С-пре-альфа могут представлять собой замену, выбранную из группы, состоящей из S11C, A13C, I16C, S62C, T65C и Y59. В некоторых вариантах осуществления пара мутантных остатков цистеина может представлять собой пару замен, выбранных из группы, состоящей из S16C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, A18C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, E19C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, F13C в С-бета и A13C в С-пре-альфа, S16C в С-бета и A13C в С-пре-альфа, A11C в С-бета и I16C в С-пре-альфа, S56C в С-бета и S62C в С-пре-альфа, S56C в С-бета и T65C в С-пре-альфа и S76C в С-бета и Y59C в С-пре-альфа, и где пара мутантных остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета содержит или представляет собой любую из SEQ ID NO: 33-41, и сконструированная С-пре-альфа содержит или представляет собой любую из SEQ ID NO: 82 и 83.

В некоторых вариантах осуществления одна или более ненативных дисульфидных связей могут образовываться в областях контакта между С-гамма и С-дельта. В некоторых вариантах осуществления область контакта на С-гамма выбрана из замен в положениях аминокислотных остатков 11-35 и 55-76. В некоторых вариантах осуществления область контакта на С-дельта выбрана из замен в положениях аминокислотных остатков 8-26, 43-64 и 84-88.

В некоторых вариантах осуществления одна или более дисульфидных связей могут образовываться между сконструированными С-гамма и С-дельта. Мутантный остаток цистеина в С-гамма может представлять собой замену, выбранную из группы, состоящей из S17C, E20C, F14C, T12C, M62C, Q57C и A19C, и/или мутантные остатки цистеина в С-дельта могут представлять собой замену, выбранную из группы, состоящей из F12C, M14C, N16C, D46C, V50C, F87C и E88C. В некоторых вариантах осуществления пара мутантных остатков цистеина может представлять собой пару замен, выбранных из группы, состоящей из S17C в С-гамма и F12C в С-дельта, E20C в С-гамма и F12C в С-дельта, F14C в С-гамма и M14C в С-дельта, T12C в С-гамма и N16C в С-дельта, M62C в С-гамма и D46C в С-дельта, Q57C в С-гамма и V50C в С-дельта, A19C в С-гамма и F87C в С-дельта и A19C в С-гамма и E88C в С-дельта, и где встроенная пара остатков цистеина может образовывать межцепочечную дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-гамма содержит или представляет собой любую из SEQ ID NO: 113 и 114, и сконструированная С-дельта содержит или представляет собой любую из SEQ ID NO: 115 и 116.

В некоторых вариантах осуществления, в дополнение к ненативному аминокислотному остатку, сконструированная константная область TCR может дополнительно содержать дополнительную модификацию в одном или более нативных остатках в последовательности константной области TCR дикого типа. Примеры такой дополнительной модификации включают, например, модификацию нативного остатка цистеина, модификацию нативного участка гликозилирования и/или модификацию нативной петли.

Некоторые нативные константные области TCR (такие как С-бета) содержат нативный остаток цистеина, который в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно модифицировать (например, удалять) или, альтернативно, можно сохранять в некоторых других вариантах осуществления. В некоторых вариантах осуществления нативная дисульфидная связь в гетеродимерном TCR альфа/бета между константными доменами TRAC и TRBC1 или TRBC2, т.е. между Cys4 экзона 2 TRAC и Cys2 экзона 2 TRBC1 или TRBC2 в соответствии с номенклатурой IMGT TCR, может присутствовать или отсутствовать.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нативный остаток цистеина отсутствует или присутствует в сконструированной С-бета. Например, нативный остаток цистеина в положении С74 С-бета может присутствовать или отсутствовать в сконструированной С-бета. В некоторых вариантах осуществления сконструированная С-бета, в которой отсутствует нативный остаток цистеина С74, содержит или представляет собой любую из SEQ ID NO: 32-41.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании является предпочтительным, т.к. он выдерживает и присутствие, и отсутствие нативного остатка цистеина в С-бета. Хотя предполагали (см., например, патент США № 7666604), что наличие нативных остатков цистеина в растворимых гетеродимерах TCR является неблагоприятным для способности TCR связывать лиганд, полипептидный комплекс, представленный в настоящем описа-

нии, может выдерживать наличие этого нативного остатка цистеина без отрицательного влияния на его антигенсвязывающую активность. Кроме того, полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, в отсутствие нативного остатка цистеина экспрессировался на высоком уровне, несмотря на то, что в Wu et al. mAbs, 7(2), pp. 364-376 (2005) описано противоположное, а именно, что нативная дисульфидная связь в гетеродимере TCR подходит для стабилизации гетеродимера TCR.

В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, можно модифицировать (например, удалять) или сохранять один или более нативных участков гликозилирования, присутствующих в нативных константных областях TCR. В рамках изобретения термин "участок гликозилирования" в отношении полипептидной последовательности относится к аминокислотному остатку с боковой цепью, к которой можно присоединять молекулу углевода (например, олигосахаридную структуру). Гликозилирование полипептидов, подобных антителам, как правило, является N-связанным или O-связанным. Термин "N-связанный" относится к присоединению молекулы углевода к боковой цепи остатка аспарагина, например, остатка аспарагина в трипептидной последовательности, такой как аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина. Термин "O-связанное гликозилирование" относится к присоединению одного из Сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего, к серину или треонину. Удаление нативных участков гликозилирования можно осуществлять посредством изменения аминокислотной последовательности таким образом, что заменяют одну или более из описанных выше трипептидных последовательностей (в случае участков N-связанного гликозилирования) или одного или более остатков серина или треонина (в случае участков O-связанного гликозилирования).

В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, в сконструированных константных областях TCR, например, в первой и/или второй константных областях TCR, отсутствует или присутствует по меньшей мере один нативный участок гликозилирования. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, может выдерживать удаление всех или части участков гликозилирования без влияния на экспрессию и стабильность белка, в отличие от существующего мнения о том, что наличие участков N-связанного гликозилирования в константной области TCR, такой как C-альфа (т.е. N34, N68 и N79) и C-бета (т.е. N69), необходимо для экспрессии и стабильности белка (см. Wu et al., Mabs, 7:2, 364-376, 2015).

В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, в сконструированной C-альфа отсутствует или присутствует по меньшей мере один из участков N-гликозилирования, например, N34, N68, N79 и N61. В некоторых вариантах осуществления сконструированные последовательности C-альфа, в которых отсутствует участок гликозилирования, содержат или представляют собой любую из SEQ ID NO: 44-48. В некоторых вариантах осуществления в сконструированной C-бета отсутствует или присутствует по меньшей мере один из участков N-гликозилирования, например, N69. Сконструированные последовательности C-бета (TRBC1), в которых отсутствует участок гликозилирования, содержат или представляют собой любую из SEQ ID NO: 34-36. Сконструированные последовательности C-бета (TRBC2), в которых отсутствует участок гликозилирования, содержат или представляют собой любую из SEQ ID NO: 38-40.

В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, в сконструированной C-пре-альфа отсутствует или присутствует по меньшей мере один из участков N-гликозилирования, например, N50. Сконструированная последовательность C-пре-альфа, в которой отсутствует участок гликозилирования, содержит или представляет собой SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании в сконструированной C-гамма отсутствует или присутствует по меньшей мере один из участков N-гликозилирования, например N65. В некоторых вариантах осуществления последовательность сконструированной C-гамма, в которой отсутствует участок гликозилирования, содержит или представляет собой SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления в сконструированной C-дельта отсутствует или присутствует по меньшей мере один из участков N-гликозилирования, например, N16 и N79. Последовательность сконструированной C-дельта, в которой отсутствует участок гликозилирования, содержит или представляет собой SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, можно модифицировать (например, удалять) или сохранять одну или более нативных вторичных структур, присутствующих в нативных константных областях TCR. В некоторых вариантах осуществления в полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, модифицируют (например, удаляют) или сохраняют нативную петлю (такую как петля FG и/или DE петля нативной C-бета). Термин "петля FG" и "петля DE" означает структуры, в основном, обнаруживаемые в константном домене бета-цепи TCR. Петля FG включает аминокислотные остатки 101-117 нативной C-бета и является обычно удлиненным, гидрофильным структурным элементом, образующим один из компонентов полости TCR альфа/бета против CD3. Петля DE включает аминокислотные остатки 66-71 нативной C-бета. Выравнивание последовательности константной области бета-цепи TCR с последовательностью константной области CH1 иммуноглобулина показало, что петля FG константной области бета-цепи TCR

является значительно более длинной. На фиг. 3 показаны различия константных областей между бета-цепью Т-клеточного рецептора и тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления последовательность в петле FG (YGLSENDEWTQDRAKPVT, SEQ ID NO: 79) отсутствует и/или заменена YPSN (SEQ ID NO: 80). В некоторых вариантах осуществления последовательность в нативной цепи DE (QPALNDSR, SEQ ID NO: 88) отсутствует и/или заменена QSGR (SEQ ID NO: 87). В некоторых вариантах осуществления последовательности С-бета, в которых отсутствует нативная петля FG, содержат или представляют собой любую из SEQ ID NO: 37-40. В некоторых вариантах осуществления последовательность С-бета, в которой отсутствуют и нативная петля FG, и нативная петля DE, содержит или представляет собой SEQ ID NO: 41.

В полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, константные области, полученные из TCR, функционально связаны с переменными областями, полученными из антитела. Переменную область тяжелой цепи или легкой цепи антитела можно функционально связывать с константной областью TCR с использованием спейсера или без него.

В некоторых вариантах осуществления первый переменный домен (VH) антитела подвергают слиянию с первой константной областью TCR (C1) в первом соединительном домене, первый переменный домен (VL) антитела подвергают слиянию со второй константной областью TCR (C2) во втором соединительном домене.

В рамках изобретения термин "соединительный домен" относится к пограничной области, где две аминокислотные последовательности подвергают слиянию или комбинируют. В некоторых вариантах осуществления соединительный домен содержит по меньшей мере часть С-концевого фрагмента из первого партнера по слиянию, слитый по меньшей мере с частью N-концевого фрагмента из второго партнера по слиянию с использованием спейсера между ними или без него. В таких вариантах осуществления соединительный домен содержит фрагменты обоих партнеров по слиянию, и точка слияния находится там, где два фрагмента соединены друг с другом, например, напрямую или через спейсер. В некоторых других вариантах осуществления соединительный домен состоит из фрагмента одного из партнеров по слиянию. В таких вариантах осуществления точка слияния может находиться на любом конце соединительного домена.

В некоторых вариантах осуществления первый соединительный домен содержит по меньшей мере часть С-концевого фрагмента область соединения V/C антитела и по меньшей мере часть N-концевого фрагмента область соединения V/C TCR.

В рамках изобретения термин "область соединения V/C антитела" относится к границе переменного домена и константного домена антитела, например, границе между переменным доменом тяжелой цепи и доменом CH1 или между переменным доменом легкой цепи и константным доменом легкой цепи. Аналогично, термин "область соединения V/C TCR" относится к границе переменного домена и константного домена TCR, например, границе между переменным доменом и константным доменом альфа-цепи TCR или между переменным доменом и константным доменом бета-цепи TCR.

Если область Fv иммуноглобулина выравнивают с иммуноглобулино-подобным доменом TCR, также будут выравнивать область соединения V/C антитела и область соединения V/C TCR. Пример приведен в табл. 1 ниже, где область соединения V/C тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO: 270) выравнивают с областью соединения V/C бета-цепи TCR (SEQ ID NO: 271) и область соединения V/C легкой цепи антитела (SEQ ID NO: 272) выравнивают с областью соединения V/C бета-цепи TCR (SEQ ID NO: 273).

Первый и/или второй соединительные домены полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, можно выбирать таким образом, чтобы они содержали фрагмент подходящей длины (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков) С-концевого фрагмента области соединения V/C антитела и фрагмент подходящей длины (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков) N-концевого фрагмента области соединения V/C TCR. Например, как показано в табл. 1, соединительный домен можно выбирать так, чтобы он содержал всю последовательность области соединения V/C TCR (см., например, SEQ ID NO: 145), или большую часть последовательности (см., например, SEQ ID NO: 147), или некоторую часть последовательности (см., например, SEQ ID NO: 146) области соединения V/C TCR. В табл. 1 также показано, что соединительный домен может содержать больше остатков из области соединения V/C TCR, чем из области соединения V/C антитела (см., например, SEQ ID NO: 147), или наоборот (см., например, SEQ ID NO: 146).

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй соединительные домены полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, имеют общую длину, сравнимую с длиной области соединения V/C антитела или области соединения V/C TCR.

Соответствующий соединительный домен можно определять с учетом структуры. Например, можно накладывать трехмерные структуры антитела и TCR, определять перекрывание области соединения V/C антитела и области соединения V/C TCR и учитывать его при определении длины или доли последовательностей области соединения V/C антитела или TCR.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй соединительный домен содержит спейсер между фрагментами из области соединения V/C антитела и области соединения V/C TCR. Можно использовать любые подходящие последовательности или длину спейсера при условии, что они не

вливают отрицательно на связывание антигена или стабильность полипептидного комплекса.

Примеры последовательностей границы переменного/константного домена антитела, границы переменного/константного домена TCR и переменного домена антитела/константной области TCR представлены ниже в табл. 1-6.

В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-бета, и C2 содержит сконструированную С-альфа. В качестве иллюстративного примера, в табл. 1 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для VH антитела, слитого с С-бета TCR, или VL антитела, слитого с С-альфа TCR. Границу VH антитела/константного домена выравнивают с границей переменного домена/С-бета TCR, и границу VL антитела/константного домена выравнивают по границе переменного домена/С-альфа TCR. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 144, 145, 146 или 147), при этом первый или второй соединительный домен подчеркнут. В таких вариантах осуществления первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 49 или 50. В таких вариантах осуществления второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 51 или 52.

Таблица 1
Дизайн первого и второго соединительного домена VH-С-бета/VL-С-альфа

	Область соединения (тяжелая цепь)			Область соединения (легкая цепь)	
	Переменн ый домен	Константн ый домен		Переменн ый домен	Константный домен
VH антитела SEQ ID NO: 270LVTVS S	AS-- TKGPS... ...	VL антитела SEQ ID NO: 272KVEIK	RTVAAPSVF
TCR_бета SEQ ID NO: 271 RLTV LE	DLKNVF PPE	TCR_альфа SEQ ID NO: 273 KLHK	PDIQNPDPA
H_область соединени_1 SEQ ID NO: 144LVTVS <u>S</u>	<u>ASKNVF</u> PPE	L_ область соединения_ 1 SEQ ID NO: 146KVEIK	RTVAAPDP <u>A</u>
H_ область соединения_ 2LVTV LE	DLKNVF PPE	L_ область соединения_ 2KVEIK	PDIQNPDPA
SEQ ID NO: 145			SEQ ID NO: 147		

В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-альфа, и C2 содержит сконструированную С-бета. В табл. 2 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для VH антитела, слитого с С-альфа TCR, или для VL антитела, слитого с С-бета TCR. Границу VH антитела/константного домена выравнивают с границей переменного домена TCR/С-альфа, и границу VL антитела/константного домена выравнивают с границей переменного домена TCR/С-бета. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 148, 149 или 150), при этом первый или второй соединительный домен подчеркнут. В таких вариантах осуществления первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 129 или 130. В таких вариантах осуществления второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 49 или 50.

Таблица 2
 Дизайн первого и второго соединительного домена VH-C-альфа/VL-C-бета

	Область соединения (тяжелая цепь)			Область соединения (легкая цепь)	
	Вариабельный домен	Константный домен		Вариабельный домен	Константный домен
Антитело_Н SEQ ID NO: 274LVT VSS	-- ASTKGPS... ...	Антитело_L SEQ ID NO: 276KVEI K--	RT--- VAAPSVF... ...
TCR_альфа SEQ ID NO: 275KLI IK--	PDIQNPD A.....	TCR_бета SEQ ID NO: 277 RLT VLE	- DLKNVFPPE
Н_область соединения_3 SEQ ID NO: 148LVT VSS	<u>ASIQNPDP</u> <u>A</u>	L_ область соединения_3 SEQ ID NO: 150KVEI <u>KLE</u>	- DLKNVFPPE
Н_ область соединения_4 SEQ ID NO: 149LVT VSS	PDIQNPD <u>A</u>	L_ область соединения_4 SEQ ID NO: 150KVEI <u>KLE</u>	- DLKNVFPPE

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-бета, и С2 содержит сконструированную С-пре-альфа. В табл. 3 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для VH антитела, слитого с С-бета TCR, или VL антитела, слитого с С-пре-альфа TCR. границу VH антитела/константного домена выравнивают с границей переменного домена TCR/С-бета, и границу VL антитела/константного домена выравнивают с границей переменного домена TCR/С-пре-альфа. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 170, 171, 169 или 156), при этом первый или второй соединительный домен подчеркнут. В таких вариантах осуществления первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 49 или 50. В таких вариантах осуществления второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 81 или 131.

Таблица 3

Дизайн первого и второго соединительного домена VH-C-бета/VL-C-пре-альфа

	Область соединения (тяжелая цепь)			Область соединения (легкая цепь)	
	Вариабельный домен	Константный домен		Вариабельный домен	Константный домен
Антитело_Н SEQ ID NO: 283LVT VSS	AS-- TKGPS.....	Антитело_L SEQ ID NO: 285KVEIK	RTVAAPSV F.....
TCR_бета SEQ ID NO: 284RLT VLE	DLKNVFPP E.....	TCR_альфа SEQ ID NO: 286KLIK	PDIQNPD A.....
			Пре-TCR_альфа SEQ ID NO: 287GCPAL	PTGVGGT PF.....
Н_область соединения_A SEQ ID NO: 170LVT VSS	ASKNVFPP E.....	L_ область соединения_A SEQ ID NO: 169KVEIK	RTVAAGT PF.....
Н_ область соединения_B SEQ ID NO: 171LVT VLE	DLKNVFPP E.....	L_ область соединения_B SEQ ID NO: 156KVEIK	PTGVGGT PF.....

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-пре-альфа, и С2 содержит сконструированную С-бета. В табл. 4 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для VH антитела, слитого с С-пре-альфа TCR, или VL антитела, слитого с С-бета TCR. Границу VH антитела/константного домена выравнивают с границей вариабельного домена TCR/С-пре-альфа, и границу VL антитела/константного домена выравнивают с границей вариабельного домена TCR/С-бета. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 172, 173, 174 или 175), при этом первый или второй соединительный домен подчеркнут. В таких вариантах осуществления первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 81, 131, 132 или 133. В таких вариантах осуществления второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 49 или 50.

Таблица 4

Дизайн первого и второго соединительного домена VH-C-пре-альфа/VL-C-бета

	Область соединения (тяжелая цепь)			Область соединения (легкая цепь)	
	Вариабельный домен	Константный домен		Вариабельный домен	Константный домен
Антитело_Н SEQ ID NO: 288LVT VSS	-- ASTKGPS... ...	Антитело_L SEQ ID NO: 291KVEI K--	RTVAAPSVF
TCR-альфа SEQ ID NO: 289KLII K--	PDIQNPDP A.....	TCR_бета SEQ ID NO: 292RLTV LE	- DLKNVFPP E.....
Пре-TCR_альфа SEQ ID NO: 290GCP AL--	PTGVGGT PF.....			
Н_область соединения_C SEQ ID NO: 172LVT VSS	<u>ASGVGGT</u> <u>PE</u>	L_ область соединения_C SEQ ID NO: 174KVEI <u>KLE</u>	- <u>DLKNVFPP</u> <u>E</u>
Н_ область соединения_D SEQ ID NO: 173LVT VSS	<u>PTGVGGT</u> <u>PE</u>	L_ область соединения_ SEQ ID NO: 175KVEI <u>KLE</u>	- <u>DLKNVFPP</u> <u>E</u>

В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную C-гамма, и C2 содержит сконструированную C-дельта. В табл. 5 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для VH антитела, слитого с C-гамма TCR, или для VL антитела, слитого с TCR C-дельта. границу VH антитела/константного домена выравнивают с границей вариабельного домена TCR/C-гамма, и границу VL антитела/константного домена выравнивают с границей вариабельного домена TCR/C-дельта. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 157, 158, 159 или 160), при этом первый или второй соединительный домен подчеркнут. В таких вариантах осуществления первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 117 или 118. В таких вариантах осуществления второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 119 или 120.

Таблица 5

Дизайн первого и второго соединительного домена VH-C-гамма/VL-C-дельта

	Область соединения (тяжелая цепь)			Область соединения (легкая цепь)	
	Вариабельный домен	Константный домен		Вариабельный домен	Константный домен
Антитело_Н SEQ ID NO: 293LVT VSS	AS--TK- GPS.....	Антитело_L SEQ ID NO: 143KV EIK	--- RTVAAPSVF... ...
TCR_гамма SEQ ID NO: 142TLV VTD	KQLDADVSPK	TCR_дельта SEQ ID NO: 55RV TVE	PRSQPHTKPS VF.....
Н_область соединения_4 SEQ ID NO: 157LVT VSS	ASLDADVSPK	L_область соединения_4 SEQ ID NO: 159KV EIK	PRSQPHTKPS VF.....
Н_область соединения_5LVT VTD	KQLDADVSPK	L_область соединения_5KV EIE	PRSQPHTKPS VF.....
5 SEQ ID NO: 158			SEQ ID NO: 160		

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-дельта, и С2 содержит сконструированную С-гамма. В табл. 6 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для VH антитела, слитого с С-дельта TCR, или для VL антитела, слитого с С-гамма TCR. Границу VH антитела/константного домена выравнивают с границей вариабельного домена TCR/С-дельта, и границу VL антитела/константного домена выравнивают с границей вариабельного домена TCR/С-гамма. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 161, 162, 163 или 164), при этом первый или второй соединительный домен подчеркнут. В таких вариантах осуществления первый соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 123 или 124. В таких вариантах осуществления второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 125 или 126.

Таблица 6

Дизайн первого и второго соединительного домена VH-C-дельта/VL-C-гамма

	Область соединения (тяжелая цепь)			Область соединения (легкая цепь)	
	Вариабельный домен	Константный домен		Вариабельный домен	Константный домен
Антитело_H SEQ ID NO: 56LVT VSS	-- ASTKGPS... ...	Антитело_L SEQ ID NO: 58KVEI K-	RTV--- AAPSVF.....
TCR_дельта SEQ ID NO: 57RV TVEP	RSQPHTKP S.....	TCR_гамма SEQ ID NO: 59TLV VTD	KQLDADVSPK PT.....
H_область соединения_6 SEQ ID NO: 161LVT VSS	RSQPHTKP S.....	L_область соединения_6 SEQ ID NO: 163KVEI KD	KQLDADVSPK PT.....
H_область соединения_7 SEQ ID NO: 162LVT VEP	RSQPHTKP S.....	L_область соединения_7 SEQ ID NO: 164KVEI TD	KQLDADVSPK PT.....

В некоторых вариантах осуществления первый полипептид содержит последовательность, содержащую домены, функционально связанные по формуле (I): VH-НСJ-С1, и второй полипептид содержит последовательность, содержащую домены, функционально связанные по формуле (II):

VL-LCJ-C2,

где VH является вариабельным доменом тяжелой цепи антитела;

НСJ является первым соединительным доменом, как определено выше;

С1 является первым константным доменом TCR, как определено выше;

VL является вариабельным доменом легкой цепи антитела;

LCJ является вторым соединительным доменом, как определено выше;

С2 является вторым константным доменом TCR, как определено выше.

В некоторых вариантах осуществления С1 является сконструированной С-альфа, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48, и С2 является сконструированной С-бета, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-41, НСJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49 и 50; LCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51 и 52.

В некоторых вариантах осуществления С1 является сконструированной С-бета, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-41, и С2 является сконструированной С-альфа, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48, НСJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и 130; LCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49 и 50.

В некоторых вариантах осуществления С1 является сконструированной С-бета, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-41, 84, 319, 320, 321, 322, 323 и 324, и С2 является сконструированной С-пре-альфа, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 и 318, НСJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49 и 50; LCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81 и 131.

В некоторых вариантах осуществления С1 является сконструированной С-пре-альфа, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 и 318, и С2 является сконструированной С-бета, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32-41, НСJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81,

131, 132 и 133; LCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49 и 50.

В некоторых вариантах осуществления C1 является сконструированной C-гамма, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 114, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339 и 340, и C2 является сконструированной C-дельта содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 и 332, HCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 117 и 118; LCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119 и 120.

В некоторых вариантах осуществления C1 является сконструированной C-дельта, содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 и 332, и C2 является сконструированной C-гамма содержащей или представляющей собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 113, 114, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339 и 340, HCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123 и 124; LCJ содержит или представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 125 и 126.

В патенте США № 9683052 описано, что некоторые остатки из области контакта между константными областями TCR можно конструировать в Fc-области для облегчения гетеродимерного спаривания двух тяжелых цепей. Такие остатки и/или соответствующие остатки из области контакта между константными областями TCR, представленными в настоящем описании, также можно конструировать в Fab-области, например, доменах CH1 и CL, для облегчения спаривания между легкой цепью и тяжелой цепью.

ii. Варибельная область антитела.

Полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, содержит первый варибельный домен тяжелой цепи (VH) и первый варибельный домен легкой цепи (VL) первого антитела. В общепринятом нативном антителе варибельная область содержит три области CDR, чередующихся с фланкирующими каркасными областями (FR), например, в соответствии со следующей формулой: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 с N-конца к C-концу. Полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, может содержать, в качестве неограничивающих примеров, такую общепринятую варибельную область антитела. Например, варибельный домен может содержать все три или менее трех CDR со всеми четырьмя или менее чем четырьмя из FR тяжелой или легкой цепи антитела при условии, что варибельный домен может специфически связываться с антигеном.

Первое антитело имеет первую антигенную специфичность. Другими словами, VH и VL образуют антигенсвязывающий участок, который может специфически связываться с антигеном или эпитопом. Антигенная специфичность может быть направлена против любого подходящего антигена или эпитопа, например, являющегося экзогенным антигеном, эндогенным антигеном, аутоантигеном, неоантигеном, вирусным антигеном или опухолевым антигеном. Экзогенный антиген попадает в организм при вдыхании, проглатывании или инъекции и может быть презентируван антигенпрезентирующими клетками (APC) посредством эндоцитоза или фагоцитоза и образования комплекса MHC II. Эндогенный антиген образуется в нормальных клетках в результате клеточного метаболизма, внутриклеточной вирусной или бактериальной инфекции и может образовывать комплекс с MHC I. Аутоантиген (например, пептид, ДНК или РНК и т.д.) распознается иммунной системой пациента, страдающего аутоиммунными заболеваниями, в то время как в нормальных условиях этот антиген не будет мишенью иммунной системы. Неоантиген полностью отсутствует в нормальном организме и образуется из-за конкретного заболевания, такого как опухоль или злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с конкретным заболеванием (например, опухолью или злокачественным новообразованием, аутоиммунными заболеваниями, инфекционными и паразитарными заболеваниями, сердечно-сосудистыми заболеваниями, невропатиями, психоневрологическими состояниями, травмами, воспалением, нарушением свертывания). В некоторых вариантах осуществления антиген ассоциирован с иммунной системой (например, иммунными клетками, такими как В-клетка, Т-клетка, NK-клетки, макрофаги и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность направлена против связанного с иммунной системой антигена или его эпитопа. Примеры связанного с иммунной системой антигена включают специфическую для Т-клеток рецепторную молекулу и/или специфическую для естественных киллеров (NK-клеток) рецепторную молекулу.

Специфичная для Т-клеток рецепторная молекула позволяет Т-клетке связываться и, при наличии дополнительных сигналов, активироваться и отвечать на эпитоп/антиген, презентируемый другой клеткой, названной антигенпрезентирующей клеткой или APC. Специфичная для Т-клеток рецепторная молекула может являться TCR, CD3, CD28, CD134 (также названным OX40), 4-1 BB, CD5 и CD95 (также известным как Fas-рецептор).

Примеры специфической для NK-клеток рецепторной молекулы включают CD16, низкоаффинный Fc-рецептор, NKG2D и CD2.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность направлена против опухолеассоциированного антигена или его эпитопа. Термин "опухолеассоциированный антиген" относится к антигену, присутствующему на поверхности опухолевой клетки, или который может быть презентируван на ней, и локализующийся на опухолевых клетках или в них. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированные антигены могут быть презентированы только опухолевыми клетками, но не нормальными, т.е. неопухолевыми клетками. В некоторых других вариантах осуществления опухолеассоциированные антигены могут экспрессироваться исключительно на опухолевых клетках или могут представлять собой опухолеспецифическую мутацию по сравнению с неопухолевыми клетками. В некоторых других вариантах осуществления опухолеассоциированные антигены можно обнаружить в опухолевых клетках и неопухолевыми клетках, но они гиперэкспрессированы на опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми клетками или доступны для связывания антителом в опухолевых клетках по причине менее компактной структуры опухолевой ткани по сравнению с неопухолевыми тканью. В некоторых вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген локализован в сосудах опухоли.

Иллюстративными примерами опухолеассоциированного поверхностного антигена являются CD10, CD19, CD20, CD22, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), протеогликан хондроитинсульфат 4 (CSPG4, меланома-ассоциированный протеогликан хондроитинсульфат), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), Her2neu, Her3, IGFR, IL3R, активирующий фибробласты белок (FAP), CDCP1, дерлин-1, тенацин, frizzled 1-10, сосудистые антигены VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR-альфа (CD140a), PDGFR-бета (CDHOb), эндоглин, CLEC14, Tem1-8 и Tie2. Дополнительные примеры могут включать A33, CAMPATH-1 (CDw52), карциноэмбриональный антиген (CEA), карбоангидразу IX (MN/CA IX), de2-7 EGFR, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, фолат-связывающий белок, G250, Fms-подобную тирозинкиназу 3 (FLT-3, CD135), c-Kit (CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, рецептор ИЛ-2, IL3R, MCSP (меланома-ассоциированный поверхностный протеогликан хондроитинсульфат), Muc-1, простатспецифический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический антиген (PSA) и TAG-72.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность направлена против антигена или его эпитопа, выбранного из группы, состоящей из CD3, 4.1BB (CD137), OX40 (CD134), CD16, CD47, CD19, CD20, CD22, CD33, CD38, CD123, CD133, CEA, cdH3, EpCAM, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), EGFRvIII (мутантной формы EGFR), HER2, HER3, dLL3, BCMA, сиалил-Lea, 5T4, ROR1, меланома-ассоциированного протеогликана хондроитинсульфата, мезотелина, рецептора фолата 1, рецептора VEGF, EpCAM, HER2/neu, HER3/neu, G250, CEA, MAGE, протеогликанов, VEGF, FGFR, альфа-V-бета-3-интегрина, HLA, HLA-DR, ASC, CD1, CD2, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD11, CD13, CD14, CD21, CD23, CD24, CD28, CD30, CD37, CD40, CD41, CD44, CD52, CD64, c-erb-2, CALLA, МНСР, CD44v3, CD44v6, p97, ганглиозида GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1b, GT3, GQ1, NY-ESO-1, NFX2, SSX2, SSX4 Trp2, gp100, тирозиназы, Muc-1, теломеразы, сурвивина, G250, p53, CA125 MUC, антигена Wue, антигена Льюиса Y, HSP-27, HSP-70, HSP-72, HSP-90, Pgp, MCSP, EpHA2 и антигенов поверхности клетки GC182, GT468 или GT512.

Вариабельные домены антитела можно получать из родительского антитела. Родительское антитело может являться антителом любого типа, включая, например, полностью человеческое антитело, гуманизированное антитело или антитело животного (например, мыши, крысы, кролика, овцы, коровы, собаки и т.д.), родительское антитело может являться моноклональным антителом или поликлональным антителом.

В некоторых вариантах осуществления родительское антитело является моноклональным антителом. Моноклональное антитело можно получать различными известными в этой области способами, например, посредством гибридомной технологии, рекомбинантного способа, фагового дисплея или любой их комбинации.

Гибридомная технология включает слияние антитело-экспрессирующих В-клеток с иммортализованной линией В-клеток для получения гибридом, далее подвергаемых скринингу на желаемые характеристики, такие как высокий уровень продукции антител, хороший рост гибридомных клеток и сильное связывание или хорошая биологическая активность антитела (см., например, Harlow et al., (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.).

Рекомбинантный способ является другим способом получения родительского антитела. В кратком изложении, получают и идентифицируют клетки, такие как лимфоциты, секретирующие интересующие антитела, и выделяют отдельные клетки с последующей ПЦР с обратной транскрипцией для получения кДНК вариабельных областей тяжелой и легкой цепи. Эти последовательности кДНК вариабельных областей можно использовать для конструирования кодирующей последовательности полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, а затем экспрессии в подходящей клетке-хозяине (обзор см., например, в патенте США № 5627052; публикации PCT № WO 92/02551; и Babcock et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848).

Библиотеки антител являются другой альтернативой для получения родительского антитела. В кратком изложении, можно осуществлять скрининг библиотеки антител для идентификации антитела,

имеющего желаемую специфичность связывания. Способы такого скрининга рекомбинантных библиотек антител хорошо известны в этой области и включают способы, описанные, например, в патенте США № 5223409; публикациях РСТ №№ WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690 и WO 97/29131; Fuchs et al., (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al., (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse et al., (1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554; Griffiths et al., (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson et al., (1991) *Nature* 352:624-628; Gram et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad et al., (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom et al., (1991) *Nucl. Acid Res.* 19:4133-4137; и Barbas et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; и публикации патентной заявки № 20030186374.

Другим иллюстративным способом получения родительского антитела является фаговый дисплей (см., например, Brinkman et al., (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames et al., (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough et al., (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic et al., (1997) *Gene* 187 9-18 и патенты США №№ 5698426; 5223409; 5403484; 5580717; 5427908; 5750753; 5821047; 5571698; 5427908; 5516637; 5780225; 5658727; 5733743 и 5969108). Полинуклеотидные последовательности, кодирующие домены антитела, встраивают в фаговые частицы для получения библиотеки фаговых частиц, экспонирующих различные функциональные домены антител. Fd и M13 являются часто используемыми нитевидными фагами, и функциональные домены антитела, экспонируемые на фаговых частицах, могут являться, например, Fab, Fv или стабилизируемым дисульфидной связью Fv, рекомбинантно слитыми с фаговым белком, кодируемым геном III или геном VIII. Фаговую библиотеку можно подвергать скринингу с использованием интересующего антигена, например, необязательно, меченого или связанного или фиксированного на твердой подложке (например, частице). В случае выбранного фага его полинуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные домены антитела, получают и используют в конструировании полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании. Аналогично, можно получать дрожжевую библиотеку, экспонирующую вариабельные домены антитела, связывая домены антитела со стенкой дрожжевой клетки (см., например, патент США № 6699658), а затем осуществлять скрининг с использованием связанного антигена для получения родительского антитела, которое можно использовать для конструирования полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании.

Кроме того, родительское антитело также можно получать посредством инъекции интересующего антигена трансгенному, не являющемуся человеком животному, содержащему некоторую часть или весь иммуноглобулиновый локус человека, например, OmniRat, OmniMouse (см., например, Osborn M. et al., *Journal of Immunology*, 2013, 190: 1481-90; Ma B. et al., *Journal of Immunological Methods* 400-401 (2013) 78-86; Geurts A. et al., *Science*, 2009, 325:433; патент США № 8907157; патент № EP 2152880 B1; патент № EP 2336329 B1), мыши HuMab (подробности см. в Lonberg, N. et al., *Nature* 368(6474): 856 859 (1994)), Xeno-Mouse (Mendez et al., *Nat Genet.*, 1997, 15:146-156), мышью TransChromo (Ishida et al., *Cloning Stem Cells*, 2002, 4:91-102) и мышью VelocImmune (Murphy et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111:5153-5158), Kymouse (Lee et al., *Nat Biotechnol*, 2014, 32:356-363) и трансгенный кролик (Flisikowska et al., *PLoS One*, 2011, 6:e21045).

Родительские антитела, представленные в настоящем описании, можно дополнительно модифицировать, например, для пересадки последовательностей CDR на другой каркас, для замены одного или более аминокислотных остатков в одной или более каркасных областях, для замены одного или более остатков в одной или более областях CDR для созревания аффинности и т.д. Это может осуществлять специалист в этой области общепринятыми способами.

Родительское антитело также может являться терапевтическим антителом, известным в этой области, например антителом, одобренным FDA для терапевтического или диагностического использования, или антителом, находящимся на стадии клинического испытания для лечения заболевания, или антителом, находящимся на стадии исследования и разработки. Полинуклеотидные последовательности и белковые последовательности вариабельных областей известных антител можно найти в общедоступных базах данных, таких как, например, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html.

Неограничивающие примеры терапевтических антител включают ритуксимаб (ритуксан, IDEC/Genentech/Roche) (см. например, патент США № 5736137), химерное антитело против CD20, одобренное для лечения неходжкинской лимфомы; HuMax-CD20, антитело против CD20, в настоящее время разрабатываемое Genmab, антитело против CD20, описанное в патенте США № 5500362, АМЕ-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel) и PRO70769 (заявка РСТ № РСТ/US2003/040426), трастузумаб (герцептин, Genentech) (см., например, патент США № 5677171), гуманизированное антитело против Her2/neu, одобренное для лечения рака молочной железы; пертузумаб (rhuMab-2C4, Omnitarg), в настоящее время разрабатываемый Genentech; антитело против Her2, описанное в патенте США № 4753894; цетуксимаб (эрбитукс, Imclone) (патент США № 4943533; публикация РСТ № WO 96/40210), химерное антитело против EGFR, находящееся на стадии клинических испытаний для различных злокачественных новообразований; ABX-EGF (патент США № 6235883), в настоя-

шее время разрабатываемое Abgenix-Immunex-Amgen; HuMax-EGFr (патент США № 7247301), в настоящее время разрабатываемое Genmab; 425, EMD55900, EMD62000 и EMD72000 (Merck KGaA) (патент США № 5558864; Murthy et al., (1987) Arch. Biochem. Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., (1987) J. Cell. Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., (1991) Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (публикация PCT № WO 95/20045; Modjtahedi et al., (1993) J. Cell Biophys. 22(1-3): 129-46; Modjtahedi et al., (1993) Br. J. Cancer 67(2):247-53; Modjtahedi et al., (1996) Br. J. Cancer 73(2):228-35; Modjtahedi et al., (2003) Int. J. Cancer 105(2):273-80); TheraCIM hr3 (YM Biosciences, Canada и Centra de ImmunologiaMolecular, Cuba (патент США № 5891996; патент США № 6506883; Mateo et al., (1997) Immunotechnol. 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (публикация PCT № WO 0162931); и SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138); алемтузумаб (кэмпас, Millenium), гуманизованное mAb, в настоящее время одобренное для лечения хронического В-клеточного лимфоцитарного лейкоза; муромонаб-CD3 (Orthoclone OKT3), антитело против CD3, разработанное IDEC/Schering AG, гемтузумабозогамицин (милотарг), антитело против CD33 (белка p67), разработанное Celltech/Wyeth, алефацепт (амевив), слитый белок против LFA-3 Fc, разработанный Biogen), абциксимаб (ReoPro), разработанный Centocor/Lilly, базиликсимаб (симулект), разработанный Novartis, паливизумаб (синагис), разработанный Medimmune, инфликсимаб (ремикейд), антитело против ФНО альфа, разработанное Centocor, адалимумаб (хумира), антитело против ФНО альфа, разработанное Abbott, хумикейд, антитело против ФНО альфа, разработанное Celltech, голимумаб (CNTO-148), полностью человеческое антитело против ФНО, разработанное Centocor, этанерцепт (энбрел), слитый белок рецептора ФНО p75 и Fc, разработанный Immunex/Amgen, ленерцепт, слитый белок рецептора ФНО p55 и Fc, разработанный Roche, ABX-CBL, антитело против CD147, разработанное Abgenix, ABX-IL8, антитело против ИЛ-8, разработанное Abgenix, ABX-MA1, антитело против MUC18, разработанное Abgenix, пемтумомаб (R1549, 90Y-muHMFG1), антитело против MUC1, разрабатываемое Antisoma, Therex (R1550), антитело против MUC1, разработанное Antisoma, AngioMab (AS 1405), разработанное Antisoma, HuBC-1, разработанное Antisoma, тиоплатин (AS 1407), разработанный Antisoma, антегерен (нагализумаб), антитело против альфа-4-бета-1 (VLA-4) и альфа-4-бета-7, разработанное Biogen, VLA-1 mAb, антитело против интегрина VLA-1, разработанное Biogen, mAb LTBR, антитело против рецептора лимфотоксина бета (LTBR), разработанное Biogen, CAT-152, антитело против TGF-бета 2, разработанное Cambridge Antibody Technology, ABT 874 (J695), антитело против ИЛ-12 p40, разработанное Abbott, CAT-192, антитело против TGF-бета 1, разработанное Cambridge Antibody Technology и Genzyme, CAT-213, антитело против эотаксина 1, разработанное Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B, антитело против Blys, разработанное Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, антитело против TRAIL-R1, разработанное Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences, Inc., авастин бевацизумаб, rhuMAB-VEGF), антитело против VEGF, разработанное Genentech, антитело против семейства рецепторов HER, разработанное Genentech, антитело против тканевого фактора (ATF), разработанное Genentech, Xolair (Omalizumab), антитело против IgE, разработанное Genentech, раптив (эфализумаб), антитело против CD11a, разработанное Genentech и Хота, антитело MLN-02 (ранее известное как LDP-02), разработанное Genentech и Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, антитело против CD4, разработанное Genmab, HuMax-IL15, антитело против IL15, разработанное Genmab и Amgen, HuMax-Inflam, разработанное Genmab и Medarex, HuMax-Cancer, антитело против гепараказы I, разработанное Genmab, Medarex и Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, разработанное Genmab и Amgen, HuMax-TAC, разработанное Genmab, IDEC-131, антитело против CD40L, разработанное IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (кленоликсимаб), антитело против CD4, разработанное IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, антитело против CD80, разработанное IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, антитело против CD23, разработанное IDEC Pharmaceuticals, антитела против фактора, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), разработанные IDEC Pharmaceuticals, BEC2, антиидиотипическое антитело, разработанное Imclone, IMC-1C11, антитело против KDR, разработанное Imclone, DC101, антитело против flk-1, разработанное Imclone, антитела против кадгерина VE, разработанные Imclone, CEA-Cide (лабетузумаб), антитело против карциноэмбрионального антигена (CEA), разработанное Immunomedics, LymphoCide (эпратузумаб), антитело против CD22, разработанное Immunomedics, AFP-Cide, разработанное Immunomedics, MyelomaCide, разработанное Immunomedics, LkoCide, разработанное Immunomedics, ProstaCide, разработанное Immunomedics, MDX-010, антитело против CTLA4, разработанное Medarex, MDX-060, антитело против CD30, разработанное Medarex, MDX-070, разработанное Medarex, MDX-018, разработанное Medarex, Osidem (IDM-1), антитело против Her2, разработанное Medarex и Immuno-Designed Molecules, HuMax-CD4, антитело против CD4, разработанное Medarex и Genmab, HuMax-IL15, антитело против ИЛ-15, разработанное Medarex и Genmab, CNTO 148, антитело против ФНО альфа, разработанное Medarex и Centocor/J&J, CNTO 1275, антитело против цитокинов, разработанное Centocor/J&J, MOR101 и MOR102, антитела против внутриклеточной молекулы адгезии-1 (ICAM-1) (CD54), разработанные MorphoSys, MOR201, антитело против рецептора фактора роста фибробластов 3 (FGFR-3), разработанное MorphoSys, Nuvion (висилизумаб), антитело против CD3, разработанное Protein Design Labs, HuZAF, антитело про-

тив интерферона гамма, разработанное Protein Design Labs, антитело против интегрин альфа-5-бета-1, разработанное Protein Design Labs, антитело против ИЛ-12, разработанное Protein Design Labs, ING-1, антитело против Еp-CAM, разработанное Хома, Холар (омализумаб), гуманизированное антитело против IgE, разработанное Genentech и Novartis, и MLN01, антитело против интегрин бета-2, разработанное Хома. В другом варианте осуществления терапевтические средства включают KRN330 (Kirin); антитело huA33 (A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (против интегрин альфа V, Centocor); MEDI-522 (против интегрин альфа-V-бета-3, Medimmune); волоциксимаб (против интегрин альфа-V-бета-1, Biogen/PDL); mAb 216 человека (против В-клеточного гликозилированного эпитопа, NCI); ViTE MT103 (биспецифический, CD19×CD3, Medimmune); 4G7×H22 (биспецифический, В-клетки×Fc-гамма R1, Medarex/Merck KGa); rM28 (биспецифический CD28×MAPG, патент EP № EP1444268); MDX447 (EMD 82633) (биспецифический, CD64×EGFR, Medarex); катумаксимаб (ремоваб) (биспецифический, EpCAM×CD3, Trion/Fres); эртумаксимаб (биспецифический, HER2/CD3, Fresenius Biotech); ореговомаб (OvaRex) (CA-125, ViRex); ренкарекс (WX G250) (против карбоангидразы IX, Wilex); CNTO 888 (CCL2, Centocor); TRC105 (против CD105 (эндоглина), Traction); BMS-663513 (агонист CD137, Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19, Medarex); сиплизумаб (MEDI-507) (CD2, Medimmune); офатумумаб (Humax-CD20) (CD20, Genmab); ритуксимаб (ритуксан) (против CD20, Genentech); велтузумаб (hA20) (против CD20, Immunomedics); эпратузумаб (против CD22, Amgen); люмиликсимаб (IDEC 152) (против CD23, Biogen); муромонаб-CD3 (против CD3, Ortho); HuM291 (несвязывающееся с Fc-рецептором антитело против CD3, PDL Biopharma); HeFi-1 (против CD30, NCI); MDX-060 (против CD30, Medarex); MDX-1401 (против CD30, Medarex); SGN-30 (против CD30, Seattle Genentech); SGN-33 (линтузумаб) (против CD33, Seattle Genentech); занолимумаб (HuMax-CD4) (против CD4, Genmab); HCD122 (против CD40, Novartis); SGN-40 (против CD40, Seattle Genentech); кэмпас-1h (алемтузумаб) (против CD52, Genzyme); MDX-1411 (против CD70, Medarex); hLL1 (EPB-1) (против CD74.38, Immunomedics); галиксимаб (IDEC-144) (против CD80, Biogen); MT293 (TRC093/D93) (против расщепленного коллагена, Traction); HuLuc63 (против CS1, PDL Pharma); ипилимумаб (MDX-010) (против CTLA4, Bristol Myers Squibb); тремелимумаб (тицилимумаб, CP-675.2) (против CTLA4, Pfizer); HGS-ETR1 (мапатумумаб) (агонист DR4 TRAIL-R1, Human Genome Science/Glaxo Smith Kline); AMG-655 (против DR5, Amgen); апомаб (против DR5, Genentech); CS-1008 (против DR5, Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (лексатумумаб) (агонист DR5 TRAIL-R2, HGS); цетуксимаб (эрбитукс) (против EGFR, Imclone); IMC-11F8 (против EGFR, Imclone); нимотузумаб (против EGFR, YM Bio); панитумумаб (вектабикс) (против EGFR, Amgen); залутумумаб (HuMaxEGFr) (против EGFR, Genmab); CDX-110 (против EGFRvIII, AVANT Immunotherapeutics); адекватумумаб (MT201) (против Ерсам, Merck); эдреколомаб (Panorex, 17-1A) (против Ерсам, Glaxo/Centocor); MORAb-003 (против рецептора фолата а, Morphotech); KW-2871 (против ганглиозида GD3, Kyowa); MORAb-009 (против GP-9, Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (против hCgb, Celldex); трастузумаб (герцептин) (против HER2, Celldex); пертузумаб (rhuMAb 2C4) (против HER2 (DI), Genentech); аполизумаб (против бета-цепи HLA-DR, PDL Pharma); AMG-479 (против IGF-1R, Amgen); антитело против IGF-1R R1507 (против IGF1-R, Roche); CP 751871 (против IGF-R, Pfizer); IMC-A12 (против IGF1-R, Imclone); ВИБ022 (против IGF-1R, Biogen); Мик-бета-1 (против IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche); CNTO 328 (против ИЛ-6, Centocor); антитело против KIR (1-7F9) (против Ig-подобного рецептора естественных киллеров (KIR), Novo); Hu3S193 (против антигена Льюиса (y), Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (против LTBR, Biogen); HuHMFGI (против MUC1, Antisoma/NCI); RAV12 (против N-связанного углеводного эпитопа, Raven); CAL (против родственного паратиреоидному гормону белка (PTH-rP), University of California); CT-011 (против PD1, CureTech); MDX-1106 (опо-4538) (против PD1, Medarex/Ono); MAb CT-011 (против PD1, Curetech); IMC-3G3 (против PDGFRa, Imclone); бавитуксимаб (против фосфатидилсерина, Peregrine); huJ591 (против PSMA, Cornell Research Foundation); muJ591 (против PSMA, Cornell Research Foundation); GC1008 ((пан)ингибитор TGFb (IgG4), Genzyme); инфликсимаб (ремикейд) (против ФНО альфа, Centocor); A27,15 (против рецептора трансферрина, Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2,3 (против рецептора трансферрина, Salk Institute); бевацизумаб (авастин) (против VEGF, Genentech); HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab, публикация PCT № WO 2000/034337, University of Texas); EVIC-18F1 (против VEGFR1, Imclone); IMC-1121 (против VEGFR2, Imclone).

а) Связывающий функциональный фрагмент против CD3.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент или второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент является связывающим функциональным фрагментом против CD3, полученным из антитела против CD3, содержащего 1, 2 или 3 последовательности CDR тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 342-344, и/или 1, 2 или 3 последовательности CDR легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO: 345-347.

Эти последовательности CDR получают из антитела против CD3, представленного в табл. А ниже. Ниже приведены последовательности CDR антитела WBP3311_2.306.4.

Таблица А

ID антитела:		CDR1	CDR2	CDR3
WBP3311_2.306.4	VH	SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 343	SEQ ID NO: 344
		GFAFTDYIYH	WISPGNVNTKYNE NFKG	DGYSLYYF DY
WBP3311_2.306.4	VL	SEQ ID NO: 345	SEQ ID NO: 346	SEQ ID NO: 347
		KSSQSLNSRTRK NYLA	WASTRQS	TQSHTLRT

Ниже приведены последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи каппа антитела WBP33112.306.4. WBP3311_2.306.4-VH.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 348):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGFAFTDYIYHWVKQRPQGGLWIGWISPG
NVNTKYENENFKGRATLTADLSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDGYSLYYFDYWGQG
TTLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 349):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTCCG
TGAGGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCGCCTTCACAGACTACTATATACACTGGG
TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGCTCTTGAGTGGATTGGATGGATTCTCCTGGAAAT
GTTAATACTAAATACAATGAAAACCTCAAGGGCAGGGCCACACTGACTGCAGACCT
ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGT
CTATTCTGTGCAAGAGATGGATATCCCTGTATTACTTTGACTACTGGGGCCAAGG
CACCCTCTCACAGTCTCCTCA

WBP3311_2.306.4-VL.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 350):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRQSGVPDRFTGSGSGTAFTLITISGVQAEDLAVYFCTQSHTLRTFSGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 351):

GACATGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGA
AGGTCATATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAG
AACTACTTGGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAACTACTAATCTAC
TGGGCATCCACTAGGCAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAGCTTCACTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTTC
TGCACGCAATCTCATACTCTCGGACGTTCCGGTGAGGCCACCAAGCTGGAAATCAA
A

Известно, что CDR отвечают за связывание антигена, однако, обнаружено, что не все из 6 CDR являются необходимыми или неизменными. Другими словами, можно заменять, или изменять, или модифицировать одну или более CDR в связывающем функциональном фрагменте против CD3, полученном из WBP3311_2.306.4, при этом, по существу, сохраняя специфическую аффинность связывания с CD3.

В некоторых вариантах осуществления связывающий функциональный фрагмент против CD3, представленный в настоящем описании, содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи антитела против CD3 WBP33112.306.4. В некоторых вариантах осуществления связывающий функциональный фрагмент против CD3, представленный в настоящем описании, содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 344. Последовательность CDR3 тяжелой цепи локализована в центре антигенсвязывающего участка, и, таким образом, считают, что она больше остальных контактирует с антигеном и обеспечивает большую часть свободной энергии в отношении аффинности антитела к антигену. Также считают, что CDR3 тяжелой цепи, несомненно, является наиболее разнообразной CDR антигенсвязывающего участка в терминах длины, композиции аминокислоты и конформации благодаря множеству механизмов диверсификации (Tonogawa S., Nature. 302:575-81 (1983)). Разнообразие CDR3 тяжелой цепи достаточно для достижения большинства специфичностей антител (Xu JL, Davis MM., Immunity. 13:37-45 (2000)), а также желаемой аффинности связывания с антигеном (Schier R, et al., J Mol Biol. 263:551-67 (1996)).

В некоторых вариантах осуществления связывающий функциональный фрагмент против CD3, представленный в настоящем описании, содержит подходящие последовательности каркасной области (FR) при условии, что связывающий функциональный фрагмент против CD3 может специфически связываться с CD3. Последовательности CDR, приведенные в табл. А, получают из антител мыши, но их можно пересаживать на любые подходящие последовательности FR любого подходящего биологического вида, такого как, помимо прочего, мышь, человек, крыса, кролик, подходящими известными в этой области способами, такими как рекомбинантные способы.

В некоторых вариантах осуществления связывающий функциональный фрагмент против CD3, представленный в настоящем описании, является гуманизированным.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованный антигенсвязывающий функциональный фрагмент, представленный в настоящем описании, состоит, по существу, из полностью человеческих последовательностей, за исключением последовательностей CDR, не принадлежащих человеку. В некоторых вариантах осуществления FR варибельной области и константные области, если они есть, получают полностью или в значительной степени из последовательностей иммуноглобулина человека. Последовательности FR человека и последовательности константной области человека можно получать из разных генов иммуноглобулинов человека, например, последовательности FR получают из одного антигена человека, а константную область - из другого антигена человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизованный антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит FR1-4 человека.

Ниже приведены последовательности варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованного антитела против CD3 WBP33112.306.4-zl.

WBP3311_2.306.4-zl-VH.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 352):

QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVWRQAPGGGLEWMGWIS
PGNVNTKYNEFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWG
QGTLVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 353):

CAGGTGCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTAGTG
TCAAGGTGTCATGCAAGGCTAGCGGGTTCGCCTTACTGACTACTACATCCACTGGG
TGCGGCAGGCTCCCGACAAAGGTTGGAGTGGATGGGATGATCTCCCCAGGCAAT
GTCAACACAAAGTACAACGAGAAGTCAAAGGCCGCGTCACCATTACCGCCGACAA
GAGCACCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTCAGAAGCGAGGACACTGCCG
TCTACTACTGTGCCAGGGATGGTACTCCCTGTATTACTTTGATTACTGGGGCCAGG
GCACACTGGTGACAGTGAGCTCC

WBP3311_2.306.4-zl-VL.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 354):

DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKYNLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTROSGVPRFSGSGSGTDFTLTISLSLAEDVAVYYCTQSHLRLTFGGGKVEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 355):

GATATCGTGATGACCCAGAGCCAGACTCCCTTGTCTCCCTCGGCGAAA
GAGCAACCATCAACTGCAAGAGCTCCCAAAGCCTGCTGAACTCCAGGACCAGGAAG
AATTACTGCGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATCTAC
TGGGCCTCCACCCGGCAGTCTGGGGTGCCTGATCGGTTTGTGGATCTGGGAGCGG
GACAGACTTCACATTGACAATTAGCTCACTGCAGCCGAGGACGTGGCCGTCTACTA
CTGTACTCAGAGCCACACTCTCCGCACATTCGGCGGAGGACTAAAGTGGAGATTA
AG

b) Антитело против CD19.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент или второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент является связывающим функциональным фрагментом против CD19, полученным из антитела против CD19, содержащего 1, 2 или 3 последовательности CDR тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-359, и/или 1, 2 или 3 последовательности CDR легкой цепи каппа, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 360-362.

Эти последовательности CDR, полученные из антитела, приведены в табл. В ниже. Ниже приведены последовательности CDR этих антител против CD19.

Таблица В

		CDR1	CDR2	CDR3
WBP7011 _4.155.8	VH	SEQ ID NO: 356	SEQ ID NO: 357	SEQ ID NO: 358
		GYAFTSYNMY	YIDPYNGDTTYNQ KFKG	TAYAMDY
W7011- 4.155.8- z1-P15	VH	SEQ ID NO: 356	SEQ ID NO: 359	SEQ ID NO: 358
		GYAFTSYNMY	YIDPYNADTTYNQ KFKG	TAYAMDY
WBP7011 _4.155.8	VL	SEQ ID NO: 360	SEQ ID NO: 361	SEQ ID NO: 362
		SASSTVNYMH	STSNLAS	HQWSSYPYT
W7011- 4.155.8- z1-P15	VL	SEQ ID NO: 360	SEQ ID NO: 361	SEQ ID NO: 362
		SASSTVNYMH	STSNLAS	HQWSSYPYT

Ниже приведены последовательности варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи каппа антитела WBP70114.155.8. WBP7011-4.155.8-VH.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 363):

IQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPY
NGDITYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSSEDAVYYCLTAYAMDYWGQGT
 VTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 364):

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
 TGAAGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGTTATGCATTCACTAGCTACAACATGACTGGG
 TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACAAT
 GGTGATACTACCTACAACCAAGTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAA
 GTCCTCCAGCACAGCCTACATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGT
 CTATTACTGTCTCACTACGGCCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 CACCGTCTCCTCA

WBP7011-4.155.8-VL.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 365):

QIVLTQSPAIMSASLGEEITLCSASSTVNYMHYQKSGTSPKLLIYSTSNLASG
 VPSRFSGSGSGTFYSLTIRSVEAEDAADYYCHQWSSYPYTFGGGKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 366):

CAAATGTCTCAGCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGA
 GATCACCCCTAACCTGCAGTGCAGCTCGACTGTAATTCATGCAGTGGTACCAGCA
 GAAGTCAGGCACCTTCTCCAAACTCTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGG
 AGTCCCTTCTCGCTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCACAATCAGA
 AGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCGATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCG
 TACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA

В некоторых вариантах осуществления связывающий функциональный фрагмент против CD19, представленный в настоящем описании содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи антитела против CD19 WBP70114.155.8 или W7011-4.155.8-z1-P15. В некоторых вариантах осуществления связывающий функциональный фрагмент против CD19, представленный в настоящем описании, содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 358. Область CDR3 тяжелой цепи локализована в центре антигенсвязывающего участка, и, таким образом, считают, что она больше остальных контактирует с антигеном и обеспечивает большую часть свободной энергии в отношении аффинности антитела к антигену. Также считают, что CDR3 тяжелой цепи, несомненно, является наиболее разнообразной CDR антигенсвязывающего участка в терминах длины, композиции аминокислоты и конформации благодаря множеству механизмов диверсификации (Tonogawa S., Nature. 302:575-81 (1983)). Разнообразие CDR3 тяжелой цепи достаточно для достижения большинства специфичностей антител (Xu JL, Davis MM., Immunity. 13:37-45 (2000)), а также желаемой аффинности связывания с антигеном (Schier R., et al., J Mol Biol. 263:551-67 (1996)).

В некоторых вариантах осуществления антитела против CD19, представленные в настоящем описании, являются гуманизированными. Ниже приведены последовательности вариabельной области тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного антитела против CD19 W7011-4.155.8-z1-P15.

W7011-4.155.8-z1-P15-VH.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 367):

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMYWVRQARGQRLEWIGYIDP
YNADITYNQKFKGRVTITRDMSTAYMELSSLRSEDAVYYCLTAYAMDYWGQGT
 LVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 368):

CAAATGCAGCTCGTCCAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCCGGGACATCCG
 TCAAGGTCTCATGTAAGGCTAGCGGGTACGCATTCATCTCCTACAACATGACTGGG
 TGCGCCAGGCCAGAGGACAGAGGTTGGAGTGGATCGGCTACATCGACCCATACAAC
 GCCGATACTACCTACAATCAGAAGTTAAAGGGCGGGTGACCATACCCGGGATAT
 GTCCACCTCCACCGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACAGCCG
 TGTACTACTGCCTGACAACAGCCTATGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCACACTTG
 TGACTGTGAGCAGT

W7011-4.155.8-z1-P15-VL.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 369):

DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCSASSTVNYMHYQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCHQWSSYPYTFGQGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 370):

GACATCCAGCTCACCAATCCCTTCTTCTCCTCCGCAAGTGTCCGAGATAG
 GGTGACTATCACTGCTCAGCTTCTCAACCGTGAACATCATGATTGGTACCAGCA
 GAAGCCCGGAAAGCCCAAAGCTGTGATCTACAGCACCTCAATCTGGCCAGTG
 GAGTGCAAGCCGGTTTAGCGGGAGCGGCTCCGGCACTGAATTCATTTGACAATTA
 GCAGCCTTACGCTGAGGACTTTGCCACATATTACTGTCACCAGTGGTCCAGCTACC
 CCTACACATTCGGGCAGGGCACAAAGCTGGAGATTAAG

Биспецифические полипептидные комплексы.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к биспецифическому полипептидному комплексу. В рамках изобретения термин "биспецифический" означает, что есть два антигенсвязывающих

функциональных фрагмента, каждый из которых может специфически связываться с иным антигеном или иным эпитопом на том же антигене. Биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, содержит первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент, содержащий первый переменный домен тяжелой цепи, функционально связанный с первой константной областью (C1) TCR, и первый переменный домен легкой цепи, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную и стабилизирующую межцепочечную связь между C1 и C2. Биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, дополнительно содержит второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент, содержащий второй антигенсвязывающий участок, но не содержит последовательность, полученную из константной области TCR.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому полипептидному комплексу, содержащему первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент, связанный со вторым антигенсвязывающим функциональным фрагментом, где

первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит

первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) T-клеточного рецептора (TCR), и

второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где:

C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между первым мутантным остатком, содержащимся в C1, и вторым мутантным остатком, содержащимся в C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер, и

первое антитело имеет первую антигенную специфичность,

второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент имеет вторую антигенную специфичность отличающуюся от первой антигенной специфичности, и

первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент менее склонны к неправильному спариванию, чем если бы первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты являлись соответствующими частями природного Fab.

Биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, значительно менее склонен к неправильному спариванию переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи. Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что стабилизированные константные области TCR в первом антигенсвязывающем функциональном фрагменте могут специфически связываться друг с другом и, таким образом, участвовать в высокоспецифическом спаривании заданных VH1 и VL1, в то же время препятствуя нежелательному неправильному спариванию VH1 или VL1 с другими переменными областями, не образующими заданные антигенсвязывающие участки.

Биспецифические полипептидные комплексы в форматах WuXiBody имеют большее время полужизни *in vivo* и их относительно проще производить по сравнению с биспецифическими полипептидными комплексами в других форматах.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, содержит второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2) второго антитела. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из VH2 и VL2 функционально связан с константной областью антитела, или оба из VH2 и VL2 функционально связаны с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи антитела, соответственно. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент дополнительно содержит константный домен CH1 антитела, функционально связанный с VH2, и константный домен легкой цепи антитела, функционально связанный с VL2. Например, второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит Fab.

Если первый, второй, третий и четвертый переменные домены (например, VH1, VH2, VL1 и VL2) экспрессируются в одной клетке, крайне желательно, чтобы VH1 специфически спаривался с VL1, и VH2 специфически спаривался с VL2, таким образом, что получаемый биспецифический белковый продукт будет иметь правильные специфичности связывания антигена. Однако, при использовании существующих технологий, таких как гибридная гибридома (или квадрома), происходит случайное спаривание VH1, VH2, VL1 и VL2, что, таким образом, приводит к образованию до десяти разных видов продукта, из которых только один является функциональной биспецифической антигенсвязывающей молекулой. Это не только снижает выход при получении, но также затрудняет очистку целевого продукта.

Биспецифические полипептидные комплексы по настоящему изобретению являются исключительными в том, что переменные домены менее склонны к неправильному спариванию, чем если бы первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты являлись соответствующими частями природного Fab. В иллюстративном примере первый антигенсвязывающий домен содержит VH1-C1, спаренный с VL1-C2, и второй антигенсвязывающий домен содержит VH2-CH1, спаренный с VL2-CL. Неожиданно обнаружено, что C1 и C2 преимущественно связываются друг с другом и менее склонны к

связыванию с CL или CH1, таким образом, препятствуют образованию нежелательных пар, таких как C1-CH, C1-CL, C2-CH и C2-CL, и значительно снижают его. В результате специфического связывания C1-C2 VH1 специфически спаривается с VL1 и, таким образом, образует первый антигенсвязывающий участок, и CH1 специфически спаривается с CL и, таким образом, делает возможным специфическое спаривание VH2-VL2, образующих второй антигенсвязывающий участок. Таким образом, первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент менее склонны к неправильному связыванию, и неправильное спаривание, например, VH1-VL2, VH2-VL1, VH1-VH2, VL1-VL2, будет значительно снижено по сравнению с тем, что бы было, если бы первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты являлись соответствующими частями природных Fab, например, в форме VH1-CH1, VL1-CL, VH2-CH1 и VL2-CL.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, при экспрессии в клетке будет иметь значительно меньше продуктов неправильного спаривания (например, меньше по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5 или более продуктов неправильного спаривания) и/или значимо более высокий выход при получении (например, по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или более высокий выход), чем референсная молекула, экспрессируемая в сравнимых условиях, где референсная молекула в остальном является идентичной биспецифическому полипептидному комплексу, за исключением того, что она содержит нативный CH1 вместо C1 и нативный CL вместо C2.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент является мультивалентным, например, бивалентным, тривалентным, тетравалентным. В рамках изобретения термин "валентный" относится к наличию определенного количества антигенсвязывающих участков в указанной молекуле. В связи с этим, термины "бивалентный", "тетравалентный" и "гексавалентный" означают наличие двух, четырех и шести участков связывания, соответственно, в антигенсвязывающей молекуле. Бивалентная молекула может являться моноспецифической, если два участка связывания предназначены для специфического связывания одного и того же антигена или эпитопа. Аналогично, тривалентная молекула может являться биспецифической, например, если два участка связывания являются моноспецифическими для первого антигена (или эпитопа), а третий участок связывания является специфическим для второго антигена (или эпитопа). В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент в биспецифическом полипептидном комплексе, представленном в настоящем описании, может являться бивалентным, тривалентным или тетравалентным, при этом по меньшей мере два участка связывания являются специфическими для одного и того же антигена или эпитопа. В некоторых вариантах осуществления это обеспечивает более сильное связывание с антигеном или эпитопом, чем в случае моновалентного антитела. В некоторых вариантах осуществления в бивалентном антигенсвязывающем функциональном фрагменте первый валентный участок связывания и второй валентный участок связывания являются структурно идентичными (т.е. имеющими одни и те же последовательности) или структурно разными (т.е. имеющими разные последовательности, несмотря на одинаковую специфичность).

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент является мультивалентным и содержит два или более антигенсвязывающих участка, функционально связанных друг с другом с использованием спейсера или без него.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит один или более фрагментов Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fd, Fv и scFv и других фрагментов, описанных в Spiess et al., 2015 выше и Brinkmann et al., 2017 выше, или их комбинацию, соединенных с использованием спейсера в тяжелой цепи и/или легкой цепи или без него и образующих по меньшей мере одно антитело, способное связываться со вторым антителом.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент содержит два или более Fab второго антитела. Два Fab можно функционально связывать друг с другом, например, первый Fab можно ковалентно соединять со вторым Fab через тяжелую цепь с использованием спейсера или без него между ними.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент дополнительно содержит первый домен димеризации, и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент дополнительно содержит второй домен димеризации. В рамках изобретения термин "домен димеризации" относится к пептидным доменам, способным связываться друг с другом для образования димера или, в некоторых примерах, делающим возможным спонтанную димеризацию двух пептидов.

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации можно связывать со вторым доменом димеризации. Связывание можно осуществлять посредством любого подходящего взаимодействия или связывания, например, посредством линкера, дисульфидной связи, водородной связи, электростатического взаимодействия, солевого мостика, гидрофобно-гидрофильного взаимодействия или их комбинации. Неограничивающие примеры доменов димеризации включают шарнирную область антитела, домен CH2 антитела, домен CH3 антитела и другие подходящие мономеры белков, способные димеризоваться и связываться друг с другом. Шарнирную область, домен CH2 и/или CH3 можно получать из любых изотипов антитела, таких как IgG1, IgG2 и IgG4.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен димеризации содержит по меньшей мере часть шарнирной области антитела. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен димеризации может дополнительно содержать домен СН2 антитела и/или домен СН3 антитела. В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй домен димеризации содержит по меньшей мере часть области шарнир-Fc, т.е. домен шарнирная область-СН2-СН3. В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации можно функционально связывать с С-концом первой константной области TCR. В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации можно функционально связывать с С-концом константной области СН1 второго антигенсвязывающего функционального фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации функционально связан (с использованием спейсера или без него) с первой константной областью TCR (C1) в третьем соединительном домене.

Если область Fv иммуноглобулина выравнивают с иммуноглобулин-подобным доменом TCR, N-конец шарнирной области антитела и N-конец шарнирной области TCR также будут выравнивать. Пример приведен в табл. 7 ниже, где N-конец шарнирной области антитела (SEQ ID NO: 278 или 279) выравнивают N-концом шарнирной области бета-цепи TCR (SEQ ID NO: 280).

Третий соединительный домен биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, можно выбирать так, чтобы он содержал фрагмент подходящей длины (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков) N-конца шарнирной области антитела и фрагмент подходящей длины (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных остатков) N-конца шарнирной области TCR. В рамках изобретения термин "N-конец шарнирной области" относится к наиболее N-концевому фрагменту шарнирной области. Например, соединительный домен можно выбирать так, чтобы он содержал все, или большую часть, или некоторые последовательности N-конца шарнирной области антитела или N-конца шарнирной области TCR, или он может содержать больше остатков из N-конца шарнирной области антитела, чем из N-конца шарнирной области TCR, или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления третьи соединительные домены полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, имеют общую длину, сравнимую с длиной N-конца шарнирной области антитела или длиной N-конца шарнирной области TCR.

Аналогично, правильный третий соединительный домен можно определять с учетом структуры. Например, можно накладывать трехмерные структуры антитела и TCR, и можно определять перекрывание N-конца шарнирной области антитела и N-конца шарнирной области TCR на наложенной структуре и учитывать его при определении длины или доли последовательностей из N-конца шарнирной области антитела или TCR.

В некоторых вариантах осуществления третий соединительный домен содержит спейсер между фрагментами N-конца шарнирной области антитела и N-конца шарнирной области TCR. Можно использовать любые подходящие последовательности или длину спейсерных последовательностей при условии, что они не влияют отрицательно на связывание антигена или стабильность полипептидного комплекса.

Примеры последовательностей N-конца шарнирной области антитела, N-конца шарнирной области TCR и третьих соединительных доменов приведены ниже в табл. 7, 8, 9 и 10.

В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-бета, и первый домен димеризации содержит шарнирную область и Fc IgG1 или IgG4. В табл. 7 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для С-бета TCR, слитой с шарнирной областью антитела. N-конец шарнирной области антитела выравнивают с N-концом шарнирной области бета-цепи TCR. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 152 или 153). В таких вариантах осуществления третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 53 или 54 (включающих третий соединительный домен и С-конец шарнирной области).

Таблица 7

Дизайн третьего соединительного домена VH-С-бета-шарнирная область

	Шарнирная область	SEQ ID NO
IgG1_Антитело_Н	EPKS-CDKTHTC.....	278
IgG4_Антитело_Н	ESK---YGPPC.....	279
TCR_бета	WGRADCGFTSVS.....	280
Область соединения'_1 (IgG1)	WGRA-SDKTHTC.....	152
Область соединения'_1 (IgG4)	WGR---YGPPC.....	153

В некоторых вариантах осуществления C1 содержит сконструированную С-альфа или С-пре-альфа, и первый домен димеризации содержит шарнирную область и Fc IgG1 или IgG4. В табл. 8 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для TCR С-альфа или С-пре-альфа, слитых с шарнирной области антитела. N-конец шарнирной области антитела выравнивают с N-концом шарнирной области С-альфа или С-пре-альфа TCR. В таких вариантах осуществления третий

соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 134, 135, 140 или 141 (включающих третий соединительный домен и С-конец шарнирной области).

Таблица 8

Дизайн третьего соединительного домена VH-С-альфа-шарнирная область

	Шарнирная область	SEQ ID NO
IgG1_Антитело_Н	EPKS- CDKTHTC.....	281
IgG4_Антитело_Н	ESK---YGPPC.....	282
TCR_альфа или TCR_пре-альфа	-----	
Область соединения' 2 (IgG1)	----SDKTHTC.....	154
Область соединения' 2 (IgG4)	-----YGPPC.....	155

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-гамма, и первый домен димеризации содержит шарнирную область и Fc IgG1 или IgG4. В табл. 9 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для С-гамма TCR, слитой с шарнирной областью антитела. N-конец шарнирной области антитела выравнивают с N-концом шарнирной области гамма-цепи TCR. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания (см., например, SEQ ID NO: 165 или 166). В таких вариантах осуществления третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 121 или 122 (включающих третий соединительный домен и С-конец шарнирной области).

Таблица 9

Дизайн третьего соединительного домена VH-С-гамма-шарнирная область

	Шарнирная область	SEQ ID NO
IgG1_Антитело_Н	EPKSCDKTHTC.....	60
IgG4_Антитело_Н	ESK---YGPPC.....	61
TCR_гамма	PPIKTDVITMD	62
Область соединения' 3 (IgG1)	PPIK SDKTHTC.....	165
Область соединения' 3 (IgG4)	PPI ---YGPPC.....	166

В некоторых вариантах осуществления С1 содержит сконструированную С-дельта, и первый домен димеризации содержит шарнирную область и Fc IgG1 или IgG4. В табл. 10 приведены примеры дизайна соединительных доменов, которые можно использовать для С-дельта TCR, слитой с шарнирной областью антитела. N-конец шарнирной области антитела выравнивают с N-концом шарнирной области дельта-цепи TCR. Примеры дизайна соединительных доменов также приведены в форме выравнивания. В таких вариантах осуществления третий соединительный домен содержится в SEQ ID NO: 127 или 128 (включающих третий соединительный домен и С-конец шарнирной области).

Таблица 10

Дизайн третьего соединительного домена VH-С-дельта-шарнирная область-Fc

	Шарнирная область и Fc	SEQ ID NO
IgG1_Антитело_Н	EPKSCDKTHTC.....	63
IgG4_Антитело_Н	ESK---YGPPC.....	103
TCR_дельта	FEVKTDSTDHV	104
Область соединения' 4 (IgG1)	EPKSSDKTHTC.....	167
Область соединения' 4 (IgG4)	ESK---YGPPC.....	168

В некоторых вариантах осуществления первый домен димеризации функционально связан с С-концом сконструированной константной области TCR, и вместе они образуют химерную константную область. Другими словами, химерная константная область содержит первый домен димеризации, функционально связанный со сконструированной константной областью TCR.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область содержит сконструированную С-бета, соединенную с первой областью шарнир-Fc, полученной из IgG1, IgG2 или IgG4. Примеры последовательностей такой химерной константной области приведены в табл. 11, 12, 13 и 14.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область содержит сконструированную С-альфа, соединенную с первой шарнирной областью, полученной из IgG1, IgG2 или IgG4. Примеры последовательностей такой химерной константной области приведены в табл. 11, 12 и 13.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область содержит сконструированную С-пре-альфа, соединенную с первой шарнирной областью, полученной из IgG1, IgG2 или IgG4, в третьем соединительном домене, содержащем или представляющим собой SEQ ID NO: 134, 135, 140 или 141. Примеры последовательностей такой химерной константной области приведены в табл. 15 и 16.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область содержит сконструированную С-гамма, соединенную с первой шарнирной областью, полученной из IgG1, IgG2 или IgG4. Примеры

ры последовательностей такой химерной константной области приведены в табл. 17 и 18.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область содержит сконструированную С-дельта, соединенную с первой шарнирной областью, полученной из IgG1, IgG2 или IgG4. Примеры последовательностей такой химерной константной области приведены в табл. 17 и 18.

В некоторых вариантах осуществления химерная константная область дополнительно содержит первый домен СН2 антитела и/или первый домен СН3 антитела.

Например, химерная константная область дополнительно содержит первый домен СН2-СН3 антитела, соединенный с С-концом третьего соединительного домена. Примеры последовательностей такой химерной константной области приведены в табл. 19.

В некоторых вариантах осуществления первая химерная константная область и второй константный домен TCR содержат пару последовательностей, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 177/176, 179/178, 184/183, 185/183, 180/176, 181/178, 182/178, 184/186, 185/186, 188/187, 196/187, 190/189, 192/191, 192/193, 195/194, 198/197, 200/199, 202/201, 203/201, 203/204, 205/204, 206/204, 208/207, 208/209, 211/210, 213/212, 213/151, 214/212, 214/151, 234/233, 232/231, 216/215, 218/217, 220/219, 222/221, 224/223, 226/225, 227/223, 229/228, 229/230, 236/235 и 238/237, как представлено в табл. 19.

Эти пары химерных константных областей и вторых константных доменов TCR полезны тем, что на них можно воздействовать для слияния с желаемой вариабельной областью антитела для получения полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании. Например, вариабельную область тяжелой цепи антитела можно подвергать слиянию с химерной константной областью (содержащей С1), таким образом, получая первую полипептидную цепь полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании; и аналогично, вариабельную область легкой цепи антитела можно подвергать слиянию со вторым константным доменом TCR (содержащим С2), таким образом, получая вторую полипептидную цепь полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании.

Эти пары химерных константных областей и вторых константных доменов TCR можно использовать в качестве платформы для получения первого антигенсвязывающего функционального фрагмента биспецифических полипептидных комплексов, представленных в настоящем описании. Например, вариабельные области первого антитела можно подвергать слиянию на N-конце последовательностей платформы (например, слиянию VH с химерным константным доменом и VL с константным доменом TCR, соответственно). Для получения биспецифического полипептидного комплекса можно конструировать и получать второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент, соединяя его в биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации содержит шарнирную область. Шарнирную область можно получать из антитела, такого как IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления второй домен димеризации, необязательно, может дополнительно содержать домен СН2 антитела и/или домен СН3 антитела, например, такой как область шарнир-Fc. Шарнирную область можно соединять с тяжелой цепью второго антигенсвязывающего участка (например, Fab).

В биспецифическом полипептидном комплексе первый и второй домен димеризации могут связываться в димер. В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации отличаются и связываются так, что препятствуют гомодимеризации и/или способствуют гетеродимеризации. Например, первый и второй домены димеризации можно выбирать так, чтобы они не были идентичными и преимущественно образовывали гетеродимеры друг с другом, а не гомодимеры сами с собой. В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации могут связываться с образованием гетеродимеров посредством "выступа-во-впадину", гидрофобного взаимодействия, электростатического взаимодействия, гидрофильного взаимодействия или повышенной гибкости.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации содержат домены СН2 и/или СН3, соответственно, подвергнутые мутации для образования "выступов-во-впадины". "Выступ" можно получать посредством замены небольшого аминокислотного остатка более крупным остатком в первом полипептиде СН2/СН3, а "впадину" можно получать посредством замены крупного остатка меньшим остатком. Подробное описание участков мутаций "выступы-во-впадину" см. в Ridgway et al., 1996, выше, Spiess et al., 2015, выше и Brinkmann et al., 2017, выше.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации содержат первый домен СН3 изотипа IgG1, содержащий замены S139C и T151W (SEQ ID NO: 295, "выступ"), и второй домен СН3 изотипа IgG1, содержащий замены Y134C, T151S, L153A и Y192V (SEQ ID NO: 296, "впадина"). В других вариантах осуществления первый и второй домены димеризации содержат первый домен СН3 изотипа IgG4, содержащий замены S136C и T148W (SEQ ID NO: 298, "выступ"), и второй домен СН3 изотипа IgG4, содержащий замены Y131C, T148S, L150A и Y189V (SEQ ID NO: 299, "впадина"). Последовательности и нумерация Fc IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 294) и Fc IgG4 дикого типа (SEQ ID NO: 297) приведены на фиг. 20A-20D. Как указано выше, обозначение XnY относится к Fc-области (например, домену СН3 Fc-области), нумерация аминокислотных остатков основана на нумерации, приведенной на фиг. 20A-20D.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй домены димеризации дополнительно содержат первую шарнирную область и вторую шарнирную область. Например, для стимуляции гетероди-

меризации в шарнирную область IgG1 и IgG2 можно встраивать замены парами заряженных остатков. Подробности см. в Brinkmann et al., 2017, выше.

Биспецифический формат.

Биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, может иметь любой подходящий биспецифический формат, известный в этой области. В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс основан на референсном формате биспецифического антитела. В рамках изобретения термин "основан на" в отношении биспецифического формата означает, что биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, имеет тот же биспецифический формат референсного биспецифического антитела, за исключением того, что формат антигенсвязывающего функционального фрагмента модифицирован так, что он содержит VH, функционально связанный с C1, и VL, функционально связанный с C2, где C1 и C2 соединяют посредством по меньшей мере одной ненативной межцепочечной связи, как определено выше. Неограничивающие примеры референсных форматов биспецифических антител, известных в этой области, включают (i) биспецифическое антитело с симметричным Fc, (ii) биспецифическое антитело с асимметричным Fc, (iii) обычное антитело, соединенное с дополнительным антигенсвязывающим функциональным фрагментом, (iv) фрагмент биспецифического антитела, (v) фрагмент обычного антитела, соединенный с дополнительным антигенсвязывающим функциональным фрагментом, (vi) биспецифическое антитело, соединенное с альбумином человека или пептидом, связывающим альбумин человека.

BsIgG является моновалентным для каждого антигена, и его можно получать посредством коэкспрессии двух легких и двух тяжелых цепей в одной клетке-хозяине. Присоединяемый IgG конструируют так, чтобы он образовывал биспецифический IgG, посредством соединения амино- или карбокси-конца легких или тяжелых цепей с дополнительными антигенсвязывающими единицами. Дополнительные антигенсвязывающие единицы могут являться однодоменными антителами (неспаренными VL или VH), такими как DVD-Ig, спаренными вариabельными доменами антитела (например, Fv или scFv) или сконструированными белковыми каркасами. Любые из антигенсвязывающих единиц в BsIgG, в частности, спаренные VH-CH1/VL-CL, можно модифицировать для замены CH1 на C1 и CL на C2, как представлено в настоящем описании, для получения биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании.

Фрагменты биспецифических антител являются антигенсвязывающими фрагментами, полученными из антитела, но в которых отсутствует некоторые или все из константных доменов антитела. Примеры такого фрагмента биспецифического антитела включают, например, однодоменное антитело, Fv, Fab и диателю и т.д. Для получения биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, антигенсвязывающий участок (например, конкретные спаренные VH-CH1/VL-CL) в фрагменте биспецифического антитела, можно модифицировать так, чтобы он включал полипептидный комплекс, как представлено в настоящем описании (например, VH-C1/CL-C2).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на формате "полного" антитела, такого как полный IgG или IgG-подобные молекулы, и небольшие рекомбинантные форматы, такие как молекулы тандемного одноцепочечного вариabельного фрагмента (taFv), диателю (Db), одноцепочечные диателю (scDb) и различные другие их производные (ср. форматы биспецифических антител, как описано в Byrne H. et al. (2013) Trends Biotech, 31 (11): 621-632. Примеры биспецифического антитела основаны на формате, включающем, в качестве неограничивающих примеров, квадрому, химически соединенные Fab (антигенсвязывающие фрагменты) и BiTE (привлекающий T-клетки биспецифический активатор).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на биспецифическом формате, выбранном из Triomab; гибридной гибридоме (квадроме); мультиспецифической антикалиновой платформы (Pieris); диателю; одноцепочечных диателю; тандемных одноцепочечных Fv-фрагментов; TandAb, триспецифических Ab (Affimed); DART (переориентирующегося антитела с двойной аффинностью; MacroGenics); биспецифических Xmab (Xencor); привлекающих T-клетки биспецифических активаторов (BiTE; Amgen; 55 кДа); Triplebody; многофункциональных рекомбинантных производных антител, слитого белка трителю (Fab-scFv) (Creative Biolabs); платформы Duobody (Genmab); платформы Dock and lock; платформы "выступ-во-впадину" (KH); гуманизованного биспецифического антитела IgG (REGN1979) (Regeneron); биспецифических антител Mab₂ (F-Star); DVD-Ig (иммуноглобулина с двойным вариabельным доменом) (Abbvie); каплямбда-тел; ТВТИ (тетравалентного биспецифического тандемного Ig) и CrossMab.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на биспецифическом формате, выбранном из биспецифических IgG-подобных антител (BsIgG), включающих CrossMab; DAF (два-в-одном); DAF (четыре-в-одном); DutaMab; DT-IgG; общей LC с "выступами-во-впадину"; сборки с "выступами-во-впадину"; пары заряженных остатков; обмена Fab-фрагментами; SEEDbody; Triomab; LUZ-Y; Fcab; каплямбда-телю и ортогонального Fab. Подробное описание форматов биспецифических антител см. Spiess C., Zhai Q. and Carter P.J. (2015) Molecular Immunology 67: 95-106, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на биспецифическом формате, выбранном из антител с "добавленным IgG" с дополнительным антигенсвязывающим функциональным фрагментом, включающих DVD-IgG; IgG(H)-scFv; scFv-(H)IgG; IgG(L)-scFv; scFv-(L)IgG; IgG(L, H)-Fv; IgG(H)-V; V(H)-IgG; IgG(L)-V; V(L)-IgG; KIH IgG-scFab; 2scFv-IgG; IgG-2scFv; scFv4-Ig; scFv4-Ig; Zybody и DVI-IgG (четыре-в-одном) (см. там же).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на формате, выбранном из фрагментов биспецифических антител, включающих нанотело; нанотело-HAS; BiTE; диатело; DART; TandAb; sc-диатело; sc-диатело-CH3; диатело-CH3; TripleBody; миниантитело; минитело; TriBimibody; scFv-CH3 KIH; Fab-scFv; scFv-CH-CL-scFv; F(ab')₂; F(ab')₂-scFv2; scFv-KIH; Fab-scFv-Fc; тетравалентное HCAb; sc-диатело-Fc; диатело-Fc; тандемное scFv-Fc и интратело (см. там же).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на биспецифическом формате, таком как Dock and Lock; ImmTAC; HSA-тело; sc-диатело-HAS и тандемное scFv-токсин (см. там же).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, основан на формате, выбранном из конъюгатов биспецифического антитела, включающих IgG-IgG; Cov-X-Body и scFv1-PEG-scFv2 (см. там же).

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй связывающий функциональный фрагмент можно соединять в Ig-подобную структуру. Ig-подобная структура подобна природному антителу, имеющему Y-образную конструкцию с двумя плечами для связывания антигена и одним стеблем для соединения и стабилизации. Сходство с природным антителом может обеспечивать различные преимущества, такие как хорошая фармакокинетика *in vivo*, желаемый иммунный ответ, стабильность и т.д. Обнаружено, что Ig-подобная структура, содержащая первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент, представленный в настоящем описании и соединенный с вторым антигенсвязывающим функциональным фрагментом, представленным в настоящем описании, имеет термостабильность, сравнимую с термостабильностью Ig (например, IgG). В некоторых вариантах осуществления Ig-подобная структура, представленная в настоящем описании, имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или 100% термостабильности природного IgG.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс содержит четыре полипептидные цепи: i) VH1-C1-шарнирная область-CH2-CH3; ii) VL1-C2; iii) VH2-CH1-шарнирная область-CH2-CH3 и iv) VL2-CL, где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь, и две шарнирные области и/или два домена CH3 могут образовывать одну или более межцепочечных связей, способствующих димеризации.

Антигенные специфичности биспецифического комплекса.

Биспецифический комплекс, представленный в настоящем описании, имеет две антигенные специфичности. Первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты имеют первую и вторую антигенные специфичности, соответственно.

Первая и вторая антигенные специфичности могут быть идентичными, другими словами, первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты связываются с одной и той же молекулой антигена или с одним и тем же эпитопом одной молекулы антигена.

Альтернативно, первая и вторая антигенные специфичности могут отличаться. Например, первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты могут связываться с разными антигенами. Такой биспецифический полипептидный комплекс можно использовать, например, в сближении двух разных антигенов и, таким образом, стимуляции их взаимодействий (например, сближении иммунных клеток с опухолевым антигеном или антигеном патогена и, таким образом, стимуляции распознавания или элиминации такого антигена иммунной системой). В качестве другого примера, первый и второй антигенсвязывающие функциональные фрагменты могут связываться с разными (и, необязательно, неперекрывающимися) эпитопами одного антигена. Это может быть полезным в усилении распознавания или связывания с антигеном-мишенью, в частности, антигена, склонного к мутациям (например, вирусного антигена).

В некоторых вариантах осуществления одна из антигенных специфичностей биспецифического комплекса, представленного в настоящем описании, направлена против специфической для T-клеток рецепторной молекулы и/или специфической для естественных киллеров (NK-клеток) рецепторной молекулы. В некоторых вариантах осуществления один из первого и второго антигенсвязывающих функциональных фрагментов может специфически связываться с CD3, TCR, CD28, CD16, NKG2D, Oх40, 4-1BB, CD2, CD5 или CD95, а другой может специфически связываться с опухолеассоциированным антигеном.

В некоторых вариантах осуществления одна из антигенных специфичностей биспецифического комплекса, представленного в настоящем описании, направлена против CD3. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент биспецифического комплекса может специфически связываться с CD3. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент биспецифического комплекса может специфически связываться с CD3.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий функциональный фрагмент биспецифического комплекса содержит VH1 и VL1, полученные из антитела против CD3. В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, где первый полипептид и второй полипептид содержат пару последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/1, 3/4, 5/1, 6/3, 7/3, 9/8, 10/8, 9/11, 10/11, 13/12, 15/14, 17/16, 17/18, 20/19, 21/12, 28/3, 29/3, 30/12, 31/12, 65/64, 67/66, 69/68, 70/68, 70/71, 72/71, 73/71, 75/74, 75/76, 78/77, 86/85, 90/89, 91/92, 94/93, 96/95, 98/97, 99/95, 101/100, 101/102, 106/105, 108/107, 110/109, 112/111, 137/136, 138/136, 137/139 и 138/139, где переменные области антитела против CD3 (T3) слиты с константной областью TCR, как показано в табл. 20.

В некоторых вариантах осуществления одна из антигенных специфичностей биспецифического комплекса, представленного в настоящем описании, направлена против специфической для Т-клеток рецепторной молекулы и/или специфической для естественных киллеров (НК-клеток) рецепторной молекулы, а другая антигенная специфичность направлена против опухлеассоциированного поверхностного антигена. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент биспецифического комплекса может специфически связываться со специфической для Т-клеток рецепторной молекулой и/или специфической для естественных киллеров (НК-клеток) рецепторной молекулой (такой как CD3), и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент может специфически связываться с опухлеассоциированным антигеном (таким как CD19), или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс содержит комбинацию четырех последовательностей, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22/12/24/23 (E17, IgG1), 25/12/26/23 (E17, IgG4) и 25/12/27/23 (F16), как показано в примере 8 и 20, где первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CD3, и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент связывается с CD19. Дизайн E17 представляет собой биспецифическое, бивалентное антитело, и дизайн F16 представляет собой биспецифический и тривалентный антигенсвязывающий комплекс с двумя повторами Fab антитела против CD19.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс содержит первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент, связывающийся с CTLA-4, и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент, связывающийся с PD-1, или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс содержит четыре полипептидные цепи, содержащие: i) VH1, функционально связанный с первой химерной константной областью; ii) VL1, функционально связанный со второй химерной константной областью; iii) VH2, функционально связанный с общепринятой константной областью тяжелой цепи антитела, и iv) VL2, функционально связанный с общепринятой константной областью легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления первая химерная константная область может содержать C1-шарнирная область-CH2-CH3, каждый из которых определен выше. В некоторых вариантах осуществления вторая химерная константная область может содержать C2, как определено выше. В некоторых вариантах осуществления общепринятая константная область тяжелой цепи антитела может содержать CH1-шарнирная область-CH2-CH3, каждый из которых определен выше. В некоторых вариантах осуществления общепринятая константная область легкой цепи антитела может содержать CL, как определено выше.

В настоящем описании следующие названия конструкций используют взаимозаменяемо: E17-Дизайн 2-QQQQ и W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP; E16-Дизайн 2-QQQQ и W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP; U6T5.G25.IgG4 и W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP; и U6T1.G25R.IgG4 и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP.

Способ получения.

Настоящее изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам или полинуклеотидам, кодирующим полипептидный комплекс и биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновым кислотам (ДНК) или рибонуклеиновым кислотам (РНК) и их полимерам в одноцепочечной или двухцепочечной форме. Если нет конкретных ограничений, термин включает полинуклеотиды, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, имеющие связывающие свойства, схожие с референсной нуклеиновой кислотой, и метаболизируемые аналогично природным нуклеотидам. Если не указано иначе, конкретная полинуклеотидная последовательность также безусловно включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также конкретно указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов можно осуществлять посредством получения последовательностей, в которых третье положение одного или более из выбранных (или всех) кодонов заменяют смешанными основаниями и/или остатками дезоксиинозина (см. Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985) и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие полипептидный комплекс и биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно конструировать рекомбинантными способами. В связи с этим, ДНК, кодирующую антигенсвязывающий функциональный фрагмент родительского антитела (такой как CDR или переменная область), можно выделять и секве-

нирывать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые могут специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Аналогично, также можно получать ДНК, кодирующую константную область TCR. Например, полинуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельный домен (VH), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую константную область TCR (C1), получают и функционально связывают, чтобы сделать возможной транскрипцию и экспрессию в клетке-хозяине для получения первого полипептида. Аналогично, полинуклеотидную последовательность, кодирующую VL, функционально связывают с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей C1, чтобы сделать возможной экспрессию второго полипептида в клетке-хозяине. При необходимости, кодирующие полинуклеотидные последовательности одного или более спейсеров также функционально связывают с другими кодирующими последовательностями, чтобы сделать возможной экспрессию желаемого продукта.

Кодирующие полинуклеотидные последовательности можно дополнительно функционально связывать с одной или более регуляторными последовательностями, необязательно, в экспрессирующем векторе, таким образом, что экспрессия или продукция первого и второго полипептидов является осуществимой и находится под правильным контролем.

Кодирующие полинуклеотидные последовательности можно встраивать в вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии рекомбинантными способами, известными в этой области. В другом варианте осуществления полипептидный комплекс и биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно получать посредством гомологичной рекомбинации, известной в этой области. Доступно множество векторов. Компоненты вектора, как правило, включают, в качестве неограничивающих примеров, одно или более из следующего: сигнальной последовательности, участка начала репликации, одного или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α) и последовательность терминации транскрипции.

В рамках изобретения термин "вектор" относится к носителю, в который можно функционально встраивать полинуклеотид, кодирующий белок, для достижения экспрессии этого белка. Как правило, конструкция также включает подходящие регуляторные последовательности. Например, молекула полинуклеотида может включать регуляторные последовательности, локализованные в 5'-фланкирующей области нуклеотидной последовательности, кодирующей геновую РНК, и/или нуклеотидной последовательности, кодирующей сайт-специфический модифицирующий полипептид, функционально связанные с кодирующими последовательностями так, чтобы сделать возможной экспрессию желаемого транскрипта/гена в клетке-хозяине. Вектор можно использовать для трансформации, трансдукции или трансфекции клетки-хозяина для достижения экспрессии генетического элемента, который он несет внутри клетки-хозяина. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная бактериальная хромосома (BAC) или полученная из P1 искусственная хромосома (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Категории вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловир, папилломавирус и паповавирус (например, SV40). Вектор может содержать различные элементы для контроля экспрессии, включая промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, подверженные селекции элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать участок начала репликации. Вектор также могут включать средства для его проникновения в клетку, включая, в качестве неограничивающих примеров, вирусную частицу, липосому или белковое покрытие.

В некоторых вариантах осуществления векторная система включает системы млекопитающих, бактерий, дрожжей и т.д. и содержит плазмиды, в качестве неограничивающих примеров, такие как pALTER, pBAD, pcDNA, pCa1, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 и т.д., и другие лабораторные и коммерчески доступные векторы. Подходящие векторы могут включать плазмиды или вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы).

Векторы, содержащие полинуклеотидные последовательности, представленные в настоящем описании, можно встраивать в клетку-хозяина для клонирования или экспрессии генов. В рамках изобретения фраза "клетка-хозяин" относится к клетке, в которую встроены экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах по настоящему изобретению являются клетками прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанными выше. Подходящие для этой цели прокариоты включают эубактерий, таких как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces.

В дополнение к прокариотам, эукариотические микроорганизмы, такие как нитевидные грибы или

дрожжи, являются подходящими организмами-хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих полипептидный комплекс и биспецифический полипептидный комплекс. *Saccharomyces cerevisiae*, или обычные пекарские дрожжи, являются наиболее широко используемыми среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако, доступен ряд других родов, видов и штаммов, и их можно использовать в настоящем изобретении, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; организмы-хозяева *Kluveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* и *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитевидные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyrocladium* и *Aspergillus*, такие как *A nidulans* и *A niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного полипептидного комплекса, биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем изобретении, получают из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Определено множество штаммов и вариантов бакуловирусов и соответствующих перmissive клеток-хозяев насекомых, таких как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Общедоступны различные штаммы вирусов для трансфекции, например, вариант L-1 NPV *Autographa californica* и штамм Bm-5 NPV *Bombyx mori*, и такие вирусы можно использовать в качестве вируса по настоящему изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Также в качестве клеток-хозяев можно использовать культуры растительных клеток хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата и табака.

Однако, наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало общепринятым способом. Примерами линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно использовать, являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных клеток почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для выращивания в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)), такие как Expi293; клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой макаки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4 и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют с использованием описанных выше экспрессирующих или клонирующих векторов, их можно культивировать в общепринятых питательных средах, модифицированных, при необходимости, для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации клонирующих векторов.

Для получения полипептидного комплекса и биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, клетки-хозяева, трансформированные с использованием экспрессирующего вектора, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM) (Sigma). Кроме того, в качестве среды для культивирования клеток-хозяев можно использовать любые из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США № Re. 30,985. При необходимости, любые из этих сред можно дополнять гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальциевые, магниевые и фосфатные соли), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определенными как неорганические соединения, как правило, присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Также можно включать любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, которые будут известны специалистам в этой области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой условия, ранее используемые для клеток-хозяев, выбранных для экспрессии, и будут очевидны специалистам в этой области.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу экспрессии полипептидного комплекса и биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, включающему культивирование клетки-хозяина, представленной в настоящем описании, в условиях, в которых экспрессируется полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, включающему а) встраивание в клет-

ку-хозяина первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) TCR, и второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, где: C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер C1 и C2, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность; б) экспрессию полипептидного комплекса клеткой-хозяином.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, включающему а) встраивание в клетку-хозяина первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) TCR, второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, содержащий с N-конца к C-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR, и один или более дополнительных полинуклеотидов, кодирующих второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент, где: C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между первым мутантным остатком, содержащимся в C1, и вторым мутантным остатком, содержащимся в C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер C1 и C2, первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент и второй антигенсвязывающий функциональный фрагмент имеют неправильное спаривание, сниженное по сравнению с тем, которое было бы, если бы первый антигенсвязывающий функциональный фрагмент был соответствующей частью природного Fab, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность, и второе антитело имеет вторую антигенную специфичность, б) экспрессию биспецифического полипептидного комплекса клеткой-хозяином.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение полипептидного комплекса.

При использовании рекомбинантных способов полипептидный комплекс, биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, может продуцироваться внутриклеточно в периплазматическом пространстве или напрямую секретироваться в среду. Если продукт продуцируется внутриклеточно, в качестве первой стадии удаляют дебрис из макрочастиц, клетки-хозяева или лизированные фрагменты, например, посредством центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) описывают способ выделения антител, секретлируемых в периплазматическом пространстве *E. coli*. В кратком изложении, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), ЭДТА и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить посредством центрифугирования. Если продукт секретирован в среду, супернатанты таких систем экспрессии, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, ультрафильтрационного блока Amicon или Millipore Pellicon. В любую из указанных выше стадий можно включать ингибитор протеазы, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза и антибиотики для предотвращения роста незапланированных контаминантов.

Полипептидный комплекс и биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании и полученный из клеток, можно очищать с использованием, например, хроматографии на гидроксиапатите, электрофореза в геле, диализа, ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, осаждения сульфатом аммония, высаливания и аффинной хроматографии, при этом аффинная хроматография является предпочтительным способом очистки.

Если полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, содержит Fc-домен иммуноглобулина, в качестве аффинного лиганда можно использовать протеин А в зависимости от биологического вида и изоформа Fc-домена, присутствующего в полипептидном комплексе. Для очистки полипептидных комплексов на основе тяжелых цепей $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека можно использовать протеин А (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Протеин G рекомендуют для всех изоформ мыши и $\gamma 3$ человека (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матрицей, к которой присоединяют аффинный лиганд, чаще всего является агароза, но доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или полистирол-дивинилбензол, делают возможными более высокие скорости потока и меньшее время обработки, чем в случае агарозы.

Если полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, содержит домен CN3, для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABX (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Доступны другие способы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин-сефарозе, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (например, в колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, электрофорез в

ПААГ в присутствии SDS и осаждение сульфатом аммония, в зависимости от выделяемого антителя.

После любых стадий предварительной очистки смесь, содержащую интересующий полипептидный комплекс и контаминантов, можно подвергать хроматографии гидрофобных взаимодействий при низком pH с использованием элюирующего буфера с pH приблизительно от 2,5-4,5, предпочтительно, осуществляемой при низких концентрациях соли (например, приблизительно от 0-0,25 М).

В некоторых вариантах осуществления биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, легко можно очищать общепринятыми способами с высоким выходом. Одним из преимуществ биспецифического полипептидного комплекса является значительно сниженное неправильное спаривание между последовательностями переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи. Это снижает продукцию нежелательных побочных продуктов и позволяет получать продукт с высокой чистотой и высоким выходом при использовании относительно простых способов очистки.

Производные.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс можно использовать в качестве основы для конъюгации с желаемыми конъюгатами.

Предполагают, что с полипептидным комплексом или биспецифическим полипептидным комплексом, представленным в настоящем описании, можно связывать различные конъюгаты (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse и R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Эти конъюгаты можно связывать с полипептидным комплексом или биспецифическим полипептидным комплексом посредством, помимо других способов, ковалентного связывания, аффинного связывания, интеркаляции, координационного связывания, комплексообразования, соединения, смешивания или добавления.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно конструировать так, чтобы он содержал специфические участки вне эпитоп-связывающей части, которые можно использовать для связывания с одним или более конъюгатами. Например, такой участок может включать один или более реакционноспособных аминокислотных остатков, таких как, например, остатки цистеина или гистидина, для облегчения ковалентного связывания с конъюгатом.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс можно связывать с конъюгатом косвенно или косвенно, например, с помощью другого конъюгата или линкера.

Например, полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, содержащий реакционноспособный остаток, такой как цистеин, можно связывать с средством, реагирующим с тиолом, в котором реакционная группа является, например, малеимидом, йодацетамидом, пиридилдисульфидом или другим реагирующим с тиолом партнером по конъюгации (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671).

В качестве другого примера, полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс можно конъюгировать с биотином, затем косвенно конъюгировать со вторым конъюгатом, конъюгированным с авидином. В качестве еще одного примера, полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс можно связывать с линкером, связанным с конъюгатом. Примеры линкером включают бифункциональные связывающие средства, такие как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидные соединения (такие как бис(p-азидобензоил)гександиамин), производные бидиазония (такие как бис-(p-дiazонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и цис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифторо-2,4-динитробензол). Особенно предпочтительные связывающие средства включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 (1978)) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP) для получения дисульфидной связи.

Конъюгат может представлять собой детектируемую метку, модифицирующий фармакокинетику функциональный фрагмент, функциональный фрагмент для очистки или цитотоксический функциональный фрагмент. Примеры детектируемой метки могут включать флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, данзил, фикоэритрин или Texas Red), фермент-субстратные метки (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, люциферазы, глюкоамилазу, лизоцим, сахаридоксидазы или β -D-галактозидазу), радиоактивные изотопы (например, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi и ^{32}P , другие лантаноиды, люминесцентные метки), хромофорный функциональный фрагмент, дигоксигенин, биотин/авидин, молекулу ДНК или золото для детекции. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой модифицирующий фармакокинетику функциональный фрагмент, такой как PEG, с помощью которого повышают время по-

лужизни антитела. Другие подходящие полимеры включают карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоль и т.п. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой функциональный фрагмент для очистки, такой как магнитные частицы. "Цитотоксический функциональный фрагмент" может являться любым средством, вредным для клеток, или средством, которое может повреждать или уничтожать клетки. Неограничивающие примеры цитотоксического функционального фрагмента включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромидин и его аналоги, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотозин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубин (ранее известный как дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее известный как актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

Способы конъюгации конъюгатов с белками, такими как антитела, иммуноглобулины или их фрагменты, можно найти, например, в патенте США № 5208020; патенте США № 6441163; WO2005037992; WO2005081711 и WO2006/034488, включенных в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Фармацевтическая композиция.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что указанные носитель, дилуэнт, эксципиенты и/или соль, как правило, химически и/или физически совместимы с другими ингредиентами, содержащимися в составе, и физиологически совместимы с реципиентом.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтическом составе, иному, чем активный ингредиент, и являющемуся приемлемым для биологической активности и нетоксичным для индивидуума. Фармацевтические приемлемые носители для использования в фармацевтических композициях, представленных в настоящем описании, могут включать, например, фармацевтически приемлемую жидкость, гель или твердые носители, водные носители, неводные носители, противомикробные средства, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, анестетики, суспендирующие/диспергирующие средства, комплексообразующие или хелатирующие средства, дилуэнты, адъюванты, эксципиенты или нетоксичные вспомогательные средства, другие компоненты, известные в этой области, или различные их комбинации.

Подходящие компоненты могут включать, например, антиоксиданты, наполнители, связывающие средства, разрыхлители, буферы, консерванты, смазочные средства, вкусовые добавки, загустители, красители, эмульгаторы или стабилизаторы, такие как сахара и циклодекстрины. Подходящие антиоксиданты могут включать, например, метионин, аскорбиновую кислоту, ЭДТА, тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, тиоглицерин, тиогликолевую кислоту, тиосорбит, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол и/или пропиленгаллат. Как представлено в настоящем описании, включение в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, одного или более антиоксидантов, таких как метионин, снижает окисление полипептидного комплекса или биспецифического полипептидного комплекса. Это снижение окисления предотвращает или снижает потерю аффинности связывания, таким образом, улучшая стабильность белка и максимизируя срок годности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композициям, содержащим полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, и один или более антиоксидантов, таких как метионин.

В качестве иллюстративного примера, фармацевтические приемлемые носители могут включать водные носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций или декстрозу и лактат Рингера для инъекций, неводные носители, такие как жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, сезамовое масло или арахисовое масло, противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, изотонические средства, такие как хлорид натрия или декстроза, буферы, такие как фосфатный или цитратный буферы, антиоксиданты, такие как бисульфат натрия, местные анестетики, такие как прокаин гидрохлорид, суспендирующие и диспергирующие средства, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидон, эмульгаторы, такие как полисорбат 80 (TWEEN-80), комплексообразующие или хелатирующие средства, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или EGTA (этиленгликольтетрауксусная кислота), этиловый спирт, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, гидроксид натрия, соляная кислота, лимонная кислота или молочная кислота. Противомикробные средства, используемые в качестве носите-

лей, можно добавлять в фармацевтические композиции в многодозовых контейнерах, включая фенолы или крезолы, ртутные препараты, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый сложные эфиры *p*-гидроксибензойной кислоты, тиомерсал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Подходящие эксципиенты могут включать, например, воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин или этанол. Подходящие нетоксичные вспомогательные средства могут включать, например, увлажнители или эмульгаторы, *pH*-буферные средства, стабилизаторы, усилители растворимости или средства, такие как ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат или циклодекстрин.

Фармацевтические композиции могут представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, пилюлю, капсулу, таблетку, состав с замедленным высвобождением или порошок. Пероральные составы могут включать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, поливинилпирролидон, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния фармацевтической категории и т.д.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют в инъекруемой композиции. Инъекруемые фармацевтические композиции можно получать в любой общепринятой форме, такой как например жидкий раствор, суспензия, эмульсия или твердые формы, подходящие для получения жидкого раствора, суспензии или эмульсии. Препараты для инъекции могут включать готовые стерильные и/или непирогенные растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для комбинирования с растворителем непосредственно перед использованием, включая подкожные таблетки, готовые стерильные суспензии для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для комбинирования с носителем непосредственно перед использованием, и стерильные и/или непирогенные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

В некоторых вариантах осуществления парентеральные препараты в однократной дозе упаковывают в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными и непирогенными, как известно в этой области.

В некоторых вариантах осуществления стерильный лиофилизированный порошок получают посредством растворения полипептидного комплекса или биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать эксципиент, улучшающий стабильность, или другие фармакологические компоненты порошка или восстановленного раствора, полученные из порошка. Эксципиенты, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, воду, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия или другой такой буфер, известный специалистам в этой области, в одном из вариантов осуществления с приблизительно нейтральным *pH*. При последующей стерильной фильтрации раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в этой области, получают желаемый состав. В одном из вариантов осуществления получаемый раствор будут распределять по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон может содержать однократную дозу или многократные дозы полипептидного комплекса, биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, или их композиции. Наполнение флаконов количеством, немного превышающим количество, необходимое для дозы или набора доз (например, приблизительно 10%), является приемлемым для облегчения точного забора доз. Лيوфилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например, при от приблизительно 4°C до комнатной температуры.

Посредством восстановления лиофилизированного порошка водой для инъекций получают состав для использования в парентеральном введении. В одном из вариантов осуществления для восстановления в лиофилизированный порошок добавляют стерильную и/или непирогенную воду или другой подходящий жидкий носитель. Точное количество зависит от выбранной терапии, и его можно определять эмпирически.

Способ лечения.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим способам, включающим: введение терапевтически эффективного количества полипептидного комплекса или биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, нуждающемуся в этом индивидууму и, таким образом, лечение или профилактику состояния или нарушения. В некоторых вариантах осуществления индивидуума определяют как имеющего нарушение или состояние, которое, вероятно, ответит на полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "лечение" состояния включает профилактику или облегчение состояния, замедление дебюта или скорости развития состояния, снижение риска развития состояния, профилактику или задержку развития симптомов, ассоциированных с состоянием, снижение или устранение симптомов, ассоциированных с состоянием, достижение полной или частичной регрессии состояния, излечение состояния или некоторую их комбинацию.

Терапевтически эффективное количество полипептидного комплекса и биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, будет зависеть от различных факторов, из-

вестных в этой области, таких как, например, масса тела, возраст, медицинский анамнез, используемые в настоящее время лекарственные средства, состояние здоровья индивидуума и потенциальные перекрестные реакции, аллергия, чувствительность и неблагоприятные побочные эффекты, а также способ введения и степень развития заболевания. Специалист в этой области (например, лечащий врач или ветеринар) может пропорционально снижать или повышать дозы с учетом этих и других обстоятельств или требований.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно вводить в терапевтически эффективной дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг (например, приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 45 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 55 мг/кг, приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 65 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 75 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 85 мг/кг, приблизительно 90 мг/кг, приблизительно 95 мг/кг или приблизительно 100 мг/кг). В некоторых из этих вариантов осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, вводят в дозе приблизительно 50 мг/кг или менее, и в некоторых из этих вариантов осуществления доза составляет 10 мг/кг или менее, 5 мг/кг или менее, 1 мг/кг или менее, 0,5 мг/кг или менее или 0,1 мг/кг или менее. В некоторых вариантах осуществления вводимую дозу можно изменять в течение лечения. Например, в некоторых вариантах осуществления начальная вводимая доза может быть выше, чем последующие вводимые дозы. В некоторых вариантах осуществления вводимую дозу можно варьировать в течение лечения в зависимости от реакции индивидуума.

Режимы дозирования можно корректировать для достижения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную дозу или можно вводить несколько дробных доз с течением времени.

Полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно вводить любым путем, известным в этой области, например, парентеральным (например, подкожным, интраперитонеальным, внутривенным, включая внутривенную инфузию, внутримышечным или внутрикожным путем посредством инъекции) или непарентеральным (например, пероральным, интраназальным, внутриглазным, сублингвальным, ректальным или местным) путями.

В некоторых вариантах осуществления состояние или нарушение, которое лечат полипептидным комплексом или биспецифическим полипептидным комплексом, представленным в настоящем описании, представляет собой злокачественное новообразование, аутоиммунные заболевания, инфекционные и паразитарные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, нейропатии, психоневрологические состояния, травмы, воспаление или нарушение свертывания.

В рамках изобретения термин "злокачественное новообразование" относится к любому заболеванию, опосредованному ростом, пролиферацией или метастазированием неопластических или злокачественных клеток, и включает солидные злокачественные новообразования и несолидные злокачественные новообразования, такие как лейкоз. В рамках изобретения термин "опухоль" относится к солидной массе неопластических и/или злокачественных клеток.

В отношении злокачественного новообразования термин "лечение" может относиться к ингибированию или замедлению роста, пролиферации или метастазирования неопластических или злокачественных клеток, профилактике или замедлению развития роста, пролиферации или метастазирования неопластических или злокачественных клеток или некоторым их комбинациям. В отношении опухоли термин "лечение" включает эрадикацию всей или части опухоли, ингибирование или замедление роста опухоли и метастазирования, профилактику или замедление развития опухоли или некоторые их комбинации.

Например, в отношении использования полипептидного комплекса или биспецифического полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, для лечения злокачественного новообразования, терапевтически эффективное количество представляет собой дозу или концентрацию полипептидного комплекса, с помощью которой можно устранить всю опухоль или ее часть, ингибировать или замедлить рост опухоли, ингибировать рост или пролиферацию клеток, опосредующих злокачественное новообразование, ингибировать метастазирование опухолевых клеток, улучшить какой-либо симптом или маркер, ассоциированный с опухолью или злокачественным новообразованием, предотвратить или замедлить развитие опухоли или злокачественного новообразования, или возможны некоторые комбинации.

В некоторых вариантах осуществления состояния и нарушения включают опухоли и злокачественные новообразования, например, мелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, почечно-клеточный рак, колоректальный рак, рак яичников, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, карциному желудка, рак мочевого пузыря, рак пищевода, мезотелиому, меланому, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, саркому, рак предстательной железы, глиобластому, рак шейки матки, карциному тимуса, лейкоз, лимфомы, миеломы, фунгиоидный микоз, рак из клеток Меркеля и другие гемобластозы, такие как классическая лимфома Ходжкина (CHL), первичную медиастинальную крупноклеточную В-

клеточную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами В-клеточную лимфому, EBV-положительный и -отрицательный PTLD и EBV-ассоциированную диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), плазмобластную лимфому, экстрадуральную НК/Т-клеточную лимфому, назофарингеальную карциному и HHV8-ассоциированную первичную выпотную лимфому, лимфому Ходжкина, неоплазию центральной нервной системы (ЦНС), такую как первичная лимфома ЦНС, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга.

В некоторых вариантах осуществления состояния и нарушения включают CD19-ассоциированное заболевание или состояние, такое как В-клеточная лимфома, необязательно, лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома, где неходжкинская лимфома включает: диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому, В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (MZL), лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (хронический лимфоцитарный лейкоз, CLL) или лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) или макроглобулинемию Вальденстрема (WM).

В некоторых вариантах осуществления состояния и нарушения включают гиперпролиферативные состояния или инфекционные заболевания, которые можно лечить посредством регуляции иммунных ответов с помощью CTLA-4 и/или PD-1. Неограничивающих примеры гиперпролиферативных состояний включают солидные опухоли, гемобласты, опухоли мягких тканей и метастатические очаги.

Полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс можно вводить в отдельности или в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими способами или средствами.

В некоторых вариантах осуществления при использовании для лечения злокачественного новообразования, или опухоли, или пролиферативного заболевания полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, можно вводить в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, хирургическим вмешательством для лечения злокачественного новообразования (например, туморэктомией), одним или более антиэметиками или другими лекарственными средствами против осложнений химиотерапии или любым другим терапевтическим средством для использования в лечении злокачественного новообразования или любого родственного заболевания. В рамках изобретения термин "вводимый в комбинации" включает одновременное введение в виде части одной и той же фармацевтической композиции, одновременное введение в виде отдельных композиций или введение в разные моменты времени в виде отдельных композиций. Композицию, вводимую до или после другого средства, считают вводимой "в комбинации" с тем средством, как эту фразу используют в настоящем описании, даже если композицию и второе средство вводят разными путями. По возможности, дополнительные терапевтические средства, вводимые в комбинации с полипептидным комплексом или биспецифическим полипептидным комплексом, представленным в настоящем описании, вводят по схеме, указанной в информационном листке дополнительного терапевтического средства, или в соответствии с Physicians' Desk Reference (Physicians' Desk Reference, 70th Ed (2016)) или протоколами, хорошо известными в этой области.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства могут индуцировать или усиливать иммунный ответ против злокачественного новообразования. Например, для индукции иммунного ответа на некоторые опухоли или злокачественные новообразования можно использовать противоопухолевую вакцину. Для усиления презентации опухолевого антигена иммунной системе также можно использовать цитокиновую терапию. Неограничивающие примеры цитокиновой терапии включают интерфероны, такие как интерферон- α , - β и - γ , колониестимулирующие факторы, такие как макрофагальный КСФ, гранулоцитарно-макрофагальный КСФ и гранулоцитарный КСФ, интерлейкины, такие как ИЛ-1, ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11 и ИЛ-12, факторы некроза опухоли, такие как ФНО α и ФНО β . Также можно использовать средства, инактивирующие иммуносупрессорные мишени, например, ингибиторы TGF-бета, ингибиторы ИЛ-10 и ингибиторы Fas-лиганда. Другая группа средств включает средства, активирующие иммунологическую реактивность в отношении опухолевых или злокачественных клеток, например, средства, повышающие активацию Т-клеток (например, агонист Т-клеточных костимуляторных молекул, таких как CTLA-4, ICOS и OX-40), и средства, повышающие функцию дендритных клеток и презентацию антигена.

Наборы.

Настоящее изобретение дополнительно относится к наборам, содержащим полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления наборы можно использовать для детекции наличия или уровня, или захвата или обогащения одной или более интересующих мишеней в биологическом образце. Биологический образец может содержать клетку или ткань.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, конъюгированный с детектируемой меткой. В некоторых других вариантах осуществления набор содержит немеченый полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании,

и дополнительно содержит вторичное меченое антитело, которое может связываться с немеченым полипептидным комплексом или биспецифическим полипептидным комплексом, представленным в настоящем описании. Набор может дополнительно содержать инструкции по использованию и упаковке, с помощью которой отделяют каждый из компонентов в наборе.

В некоторых вариантах осуществления полипептидный комплекс или биспецифический полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, связан с субстратом или устройством. Субстрат или устройство, которые можно использовать, могут представлять собой, например, магнитные частицы, планшет для микротитрования или тест-полоску. Их можно использовать для анализа связывания (такого как ELISA), иммунографического анализа, захвата или обогащения молекулы-мишени в биологическом образце.

Следующие примеры представлены для лучшего иллюстрирования описываемого в заявке изобретения, и их не следует истолковывать как ограничение объема изобретения. Все конкретные композиции, материалы и способы, описанные ниже, полностью или частично попадают в объем настоящего изобретения. Эти конкретные композиции, материалы и способы предназначены не для ограничения изобретения, а для иллюстрирования конкретных вариантов осуществления, попадающих в объем изобретения. Специалист в этой области может разрабатывать эквивалентные композиции, материалы и способы без осуществления изобретательского потенциала и без отклонения от объема изобретения. Следует понимать, что в способах, представленных в настоящем описании, можно осуществлять множество изменений, оставаясь в рамках настоящего изобретения. Авторами настоящего изобретения предусмотрено включение таких изменений в объем изобретения.

Таблица 11

Дизайн и обозначения химерных константных областей (С-бета/С-альфа)

Дизайн матрицы на основе таблицы 16	SEQ ID NO: (тяжелая цепь (HC)/легкая цепь (LC))-IgG1
Дизайн_1	177/176
Дизайн_2	179/178
Дизайн_3	184/183
Дизайн_4	185/183
Дизайн_5	180/176
Дизайн_6	181/178
Дизайн_6a	182/178
Дизайн_7	184/186
Дизайн_8	185/186

Таблица 12

Домены и SEQ ID NO химерных константных областей (С-бета/С-альфа)

Название химерной константной области и SEQ ID NO цепи:	Домены с N-конца к C-концу и их SEQ ID NO			
	Первый или второй соединительный домен (CJ)	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный домен+шарнирная область (CJ')	Домен димеризации (D)
HC Дизайн_1	HCJ1	С-бета (S56C)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 177	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_1	LCJ1	С-альфа (T49C)		
SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 43		
HC Дизайн_2	HCJ2	С-бета (S56C)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 179	SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO:

	50			302
LC Дизайн_2	LCJ2	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 178	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 43		
НС Дизайн_3	НСJ3	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FeG1
SEQ ID NO: 184	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_3	LCJ3	С-бета (S56С)		
SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 33+NO: 306		
НС Дизайн_4	НСJ4	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FeG1
SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_4	LCJ3	С-бета (S56С)		
SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 33+NO: 306		
НС Дизайн_5	НСJ1	С-бета (S56С) (FG-)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 180	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_5	LCJ1	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 43		
НС Дизайн_6	НСJ1	С-бета (S56С)(FG-)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 181	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_6	LCJ2	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 178	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 43		
НС Дизайн_6а	НСJ2	С-бета (S56С)(DE- FG-)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 182	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_6а	LCJ2	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 178	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 43		
НС Дизайн_7	НСJ3	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FeG1
SEQ ID NO: 184	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_7	LCJ3	С-бета (S56С)(FG-)		
SEQ ID NO: 186	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 37+NO: 306		
НС Дизайн_8	НСJ4	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FeG1
SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_8	LCJ3	С-бета (S56С)(FG-)		
SEQ ID NO: 186	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 37+NO: 306		

Таблица 13

Дизайн и обозначения Дизайн_2 (С-бета/С-альфа) без участков гликозилирования

Образец	SEQ ID NO: (НС-С-бета/LC-С-альфа) НС/LC
Дизайн_2-QQQQ	188/187 (IgG1) 196/187 (IgG4)
Дизайн_2-AAAA	190/189 (IgG1)
Дизайн_2-QSKE	192/191 (IgG1)
Дизайн_2-ASKE	192/193 (IgG1)
Дизайн_2-QQQQQ	195/194 (IgG1)

Таблица 14

Домены и SEQ ID NO Дизайн_2 (С-бета/С-альфа) без участков гликозилирования

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к С-концу и их SEQ ID NO			
	Первый или второй соединительный	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный	Домен димеризации (D)
	домен (CJ)		домен+шарнирная область (CJ)	
НС Дизайн_2-QQQQ (IgG1)	НСJ2	С-бета (S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 188	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2-QQQQ (IgG1)	LCJ2	С-альфа (T49C) (N34Q+N68Q + N79Q)		
SEQ ID NO: 187	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 44		
НС Дизайн_2-QQQQ (IgG4)	НСJ2	С-бета (S56C) (N69Q)	CJ'1G4	FcG4
SEQ ID NO: 196	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 303
LC Дизайн_2-QQQQ (IgG4)	LCJ2	С-альфа (T49C) (N34Q+N68Q + N79Q)		
SEQ ID NO: 187	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 44		
НС Дизайн_2-AAAA (IgG1)	НСJ2	С-бета (S56C) (N69A)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 190	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2-AAAA (IgG1)	LCJ2	С-альфа (T49C) (N34A+N68A + N79A)		

SEQ ID NO: 189	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 45		
HC Дизайн_2- QSKE (IgG1)	HCJ2	С-бета (S56C) (N69E)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- QSKE (IgG1)	LCJ2	С-альфа (T49C) (N34Q+N68S + N79K)		
SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 46		
HC Дизайн_2- ASKE (IgG1)	HCJ2	С-бета (S56C) (N69E)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 192	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- ASKE (IgG1)	LCJ2	С-альфа (T49C) (N34A+N68S + N79K)		
SEQ ID NO: 191	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 47		
HC Дизайн_2- QQQQQ (IgG1)	HCJ2	С-бета (S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- QQQQQ (IgG1)	LCJ2	С-альфа (T49C) (N34Q+N68Q + N79Q+N61Q)		
SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 48		

Таблица 15

Дизайн и обозначение химерных константных областей (С-бета/С-пре-альфа)

Матрицы на основе таблицы 16 (IgG1)	Последовательность	SEQ ID NO:
Пре-TCR_Дизайн_В	Дизайн_1_Пре_TCR_область соединения'1	198/197
	Дизайн_2_Пре_TCR_область	200/199
	соединения'1_Cys10	202/201
	Дизайн_3_Пре_TCR_область	203/201
	соединения'1_Cys11	203/204
	Дизайн_4_Пре_TCR_область	205/204
	соединения'1_Cys12	206/204
	Дизайн_5_Пре_TCR_область	208/207
	соединения'1_Cys13	208/209
	Дизайн_6_Пре_TCR_область	211/210
Пре-TCR_Дизайн_С	Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_1	213/212
Пре-TCR_Дизайн_Д	Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_1	213/215
Пре-TCR_Дизайн_С	Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_2	214/212
Пре-TCR_Дизайн_Д	Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_2	214/215

Домены и SEQ ID NO химерных константных областей (С-бета/С-пре-альфа)

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к С-концу и их SEQ ID NO			
	Первый или второй	Константны й домен	Третий соединительный	Домен димеризации
	Соединитель ный домен (CJ)	TCR (C1 или C2)	домен+шарнир ная область (CJ')	и (D)
НС Дизайн_1_Пре_TCR_о бласть соединения'1	НСJB	С-бета (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 198	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_1_Пре_TCR_о бласть соединения'1	LCJB	С-пре- альфа (N50Q)		
SEQ ID NO: 197	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 83		
НС Дизайн_2_Пре_TCR_о бласть соединения'1_Cys10	НСJB	С-бета (S76C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 200	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 319	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2_Пре_TCR_о бласть соединения'1_Cys10	LCJB	С-пре- альфа (Y59C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 199	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 311		
НС Дизайн_3_Пре_TCR_о бласть соединения'1_Cys11	НСJB	С-бета (F13C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 202	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 320	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_3_Пре_TCR_о бласть	LCJB	С-пре- альфа (A13C)(N50		

соединения'_1_Cys11		Q		
SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 312		
НС Дизайн_4_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys12	НСJB	С-бета (S16C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 321	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_4_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys12	LCJB	С-пре- альфа (A13C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 201	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 312		
НС Дизайн_5_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys13	НСJB	С-бета (S16C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 203	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 321	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_5_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys13	LCJB	С-пре- альфа (S11C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 313		
НС Дизайн_6_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys14	НСJB	С-бета (A18C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 205	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 322	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC	LCJB	С-пре-		

Дизайн_6_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys14		альфа (S11C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 313		
НС Дизайн_7_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys15	НСJB	С-бета (E19C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 206	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 323	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_7_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys15	LCJB	С-пре- альфа (S11C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 204	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 313		
НС Дизайн_8_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys1_4 L4T_1	НСJB	С-бета (S56C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 208	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_8_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys1_4 L4T_1	LCJB	С-пре- альфа (S62C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 314		
НС Дизайн_9_Пре_TCR_о бласть	НСJB	С-бета (S56C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1

соединения'_1_Cys2_4 L4T_2				
SEQ ID NO: 207	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_9_Пре_TCR_о бласть соединения'_1_Cys2_4 L4T_2	LCJB	С-пре- альфа (T65C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 315		
HC Дизайн_10_Пре_TCR_ область соединения'_1_Cys4	HCJB	С-бета (A11C)(N69 Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 211	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 324	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_10_Пре_TCR_ область соединения'_1_Cys4	LCJB	С-пре- альфа (I16C)(N50 Q)		
SEQ ID NO: 210	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 316		
HC Пре- TCR_Дизайн_5_перек рестный_1				
SEQ ID NO: 213	HCJC	С-пре- альфа (S11C)(N50 Q)	CJ'2G1	FcG1
LC Пре- TCR_Дизайн_5_перек рестный_1	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
SEQ ID NO: 212	LCJC	С-бета		

		(N69Q, S16C)		
НС Пре- TCR_Дизайн_6_перек рестный_1	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 321+ 306		
SEQ ID NO: 213				
LC Пре- TCR_Дизайн_6_перек рестный_1	НСJC	С-пре- альфа (S11C)(N50 Q)	CJ'2G4	FcG4
SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 303
НС Пре- TCR_Дизайн_5_перек рестный_2	LCJC	С-бета (N69Q, A18C)		
SEQ ID NO: 214	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 322+ 306		
LC Пре- TCR_Дизайн_5_перек рестный_2				
SEQ ID NO: 212	НСJD	С-пре- альфа (S11C)(N50 Q)	CJ'2G1	FcG1
НС Пре- TCR_Дизайн_6_перек рестный_2	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
SEQ ID NO: 214	LCJC	С-бета (N69Q, S16C)		
LC Пре- TCR_Дизайн_6_перек рестный_2	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: NO:321+ 306		
SEQ ID NO: 215	НСJD	С-пре-	CJ'2G1	FcG1
		альфа (S11C)(N50 Q)		

Таблица 17
Дизайн и обозначения химерных константных областей (С-гамма/С-дельта)

Матрицы на основе таблицы 13 (IgG1)	Конструкция	SEQ ID NO в НС/LC
dg_Дизайн_1	dg_Дизайн_1	234/233
dg_Дизайн_2	dg_Дизайн_2	232/231
	dg_Дизайн_2_без_гликозилирования	216/215
	dg_Дизайн_2_hyreCys1_без_гликозилирования	218/217
	dg_Дизайн_2_hyreCys2_без_гликозилирования	220/219
	dg_Дизайн_2_hyreCys3_без_гликозилирования	222/221
	dg_Дизайн_2_Cys2_без_гликозилирования	224/223
	dg_Дизайн_2_Cys1_без_гликозилирования	226/225
	dg_Дизайн_2_Cys3_без_гликозилирования	227/223
	dg_Дизайн_2_Cys4_без_гликозилирования	229/228
	dg_Дизайн_2_Cys5_без_гликозилирования	229/230
dg_Дизайн_3	dg_перекрестный_Дизайн_1	236/235
dg_Дизайн_4	dg_перекрестный_Дизайн_2	238/237

Таблица 18

Домены и SEQ ID NO химерных константных областей (С-гамма/С-дельта)

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к С-концу и их SEQ ID NO			
	Первый или второй соединительный домен (CJ)	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный домен+шарнир ная область (CJ')	Домен димериза ции (D)
HC dg_Дизайн_1	HCJ4	С-гамма	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 234	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_1	LCJ4	С-дельта		
SEQ ID NO: 233	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 310		
HC dg_Дизайн_2	HCJ5	С-гамма	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 232	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2	LCJ5	С-дельта		
SEQ ID NO: 231	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 115		
HC dg_Дизайн_2_без_гл икозилирования	HCJ5	С-гамма (N65Q)	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 216	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_без_гл икозилирования	LCJ5	С-дельта (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 215	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 116		
HC dg_Дизайн_2_hyreC ys1_без_гликозилир ования	HCJ5	С-гамма (T12C) (N65Q)	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 218	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_hyreC ys1_без_гликозилир ования	LCJ5	С-дельта (N16C) (N79Q)		
SEQ ID NO: 217	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 325		
HC dg_Дизайн_2_hyreC ys2_без_гликозилир ования	HCJ5	С-гамма (Q57C) (N65Q)	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 220	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 334	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302

LC dg_Дизайн_2_hyreC ys2_без_гликозилир ования	LCJ5	С-дельта (V50C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 219	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 326		
HC dg_Дизайн_2_hyreC ys3_без_гликозилир ования	HCJ5	С-гамма (M62C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 222	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_hyreC ys3_без_гликозилир ования	LCJ5	С-дельта (D46C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 221	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 327		
HC dg_Дизайн_2_Cys2_ без_гликозилирован ия	HCJ5	С-гамма (S17C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 224	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 336	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_Cys2_ без_гликозилирован ия	LCJ5	С-дельта (F12C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 328		
HC dg_Дизайн_2_Cys1_ без_гликозилирован ия	HCJ5	С-гамма (F14C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1

SEQ ID NO: 226	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_Cys1_ без_гликозилирован ия	LCJ5	С-дельта (M14C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 225	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 329		
HC dg_Дизайн_2_Cys3_ без_гликозилирован ия	HCJ5	С-гамма (E20C) (N65Q)	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 227	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 338	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_Cys3_ без_гликозилирован ия	LCJ5	С-дельта (F12C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 223	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 328		
HC dg_Дизайн_2_Cys4_ без_гликозилирован ия	HCJ5	С-гамма (A19C) (N65Q)	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_Cys4_ без_гликозилирован ия	LCJ5	С-дельта (F87C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 228	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 330		
HC dg_Дизайн_2_Cys5_	HCJ5	С-гамма (A19C)	CJ'3G1	FeG1

без_гликозилирован ня		(N65Q)		
SEQ ID NO: 229	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_Cys5_ без_гликозилирован ня	LCJ5	С-дельта (E88C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 230	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 331		
НС dg_перекрестный_Д изайн_1	НСJ6	С-дельта	СJ'4G1	FeG1
SEQ ID NO: 236	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 302
LC dg_перекрестный_Д изайн_1	LCJ6	С-гамма		
SEQ ID NO: 235	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 340		
НС dg_перекрестный_Д изайн_2	НСJ7	С-дельта	СJ'4G1	FeG1
SEQ ID NO: 238	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 302
LC dg_перекрестный_Д изайн_2	LCJ7	С-гамма		
SEQ ID NO: 237	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 340		

Таблица 19

Последовательности примеров химерных константных областей

Дизайн матрицы				
С-альфа/С-бета	Тип цепи	SEQ ID NO		Последовательности
Дизайн_1 (IgG1) нормальный	LC	176	LCJ1-C-альфа (T49C)	KRTVAAPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	177	HCJ1-C-бета (S56C)-CJ'1G1-Fc(G1)	SSASKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSAATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Дизайн_2 (IgG1) нормальный	LC	178	LCJ2-C-альфа (T49C)	KPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	179	HCJ2-C-бета (S56C)-CJ'1G1-Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSAATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

				SRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_ 5 (IgG1) нормаль ный	LC	176	LCJ1-C- альфа (T49C)	KRTVAAPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	180	HCJ1-C- бета (S56C)(F G-DE+)- CJ'1G1- Fc(G1)	SSASKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVFYPSNQIVSAEAWGRASD KTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Дизайн_ 6 (IgG1) нормаль ный	LC	178	LCJ2-C- альфа (T49C)	KPDIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	181	HCJ2-C- бета (S56C)(F G-DE+)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVFYPSNQIVSAEAWGRASD KTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Дизайн_ба (IgG1) нормальный	LC	178	LCJ2-C-альфа (T49C)	KPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	182	HCJ2-C-бета (S56C)(F G-DE+)-CJ'1G1-Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQSGRYALSSRLRVSATFWQNPRN HFRQVQFYPSNQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSPGK
Дизайн_3 (IgG1) перекрестный	LC	183	LCJ3-C-бета (S56C)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVC TDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRA
	HC	184	HCJ2-C-бета (S56C)(F G-DE+)-CJ'1G1-Fc(G1)	SSASIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCFSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
Дизайн_4 (IgG1) перекрестный	LC	183	LCJ4-C-бета (S56C)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVC TDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFW

стный				QNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRA
	HC	185	HCJ4-C- альфа (T49C)- CJ'2G1- Fc(G1)	SSPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSQKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Дизайн_7 (IgG1) перекрестный	LC	186	LCJ3-C- бета (S56C)(F G-DE+)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVC TDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQCQVQFYPSNQIVSAEAWGRA
	HC	184	HCJ3-C- альфа (T49C)- CJ'2G1- Fc(G1)	SSASIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSQKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSDKTHTCPPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Дизайн_8 (IgG1) перекрестный	LC	186	LCJ4-C- бета (S56C)(F G-DE+)	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVC TDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQCQVQFYPSNQIVSAEAWGRA
	HC	185	HCJ4-C- альфа (T49C)-	SSPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVQSQKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF

			CJ'2G1- Fc(G1)	FPSPESSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Дизайн_ 2-QQQQ (IgG1)	LC	187	LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+ N68Q+ N79Q)	KPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSA VAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	188	HCJ2-C- бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_ 2-AAAA (IgG1)	LC	189	LCJ2-C- альфа (T49C) (N34A+ N68A+N 79A)	KPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTAVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSA VAWSAKSDFACANAFANSIIPEDTF FPSPESS
	HC	190	HCJ2-C- бета	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT

			(S56C) (N69A)- CJ'1G1- Fc(G1)	DPQPLKEQPALADSRVALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_ 2-QSKE (IgG1)	LC	191	LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N 68S+N79 K)	KPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTQVQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSSKSDFACANAFKNSIIPEDTFF PSPRESS
	HC	192	HCJ2-C- бета (S56C) (N69E)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALEDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_ 2-ASKE (IgG1)	LC	193	LCJ2-C- альфа (T49C) (N34A+ N68S+N	KPDIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTAVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSSKSDFACANAFKNSIIPEDTFF PSPRESS

			79K)	
	HC	192	HCJ2-C- бета (S56C)(N 69E)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALEDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_ 2- QQQQ (IgG1)	LC	194	LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+ N68Q+N 79Q+ N61Q)	KPDIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTQVQSKSDSDVYITDKCVLDMRSMDF KSQSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	195	HCJ2-C- бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

Дизайн_2-QQQQ (IgG4)	LC	187		KPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTQVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTF FPSPESS
	HC	196	HCJ2-C- бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G4- Fc(G4)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRYGPCCPPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
Дизайн Пре-альфа-Бета	Название цепи	SEQ ID NO		Последовательности
Дизайн_1_Пре_Т CR_область соединения'1	LC	197	LCJB-C- пре- альфа (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQMMVV VCLVLDVAPPGLDSPWFSAAGQSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLSEELASWEPL VCHTGPGEAGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	198	HCJB-C- бета (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

				SRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_2_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C ys10	LC	199	LCJB-C- пре- альфа (Y59C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQQMVV VCLVLDVAPPGLDSPWFSAAGQSALDAFT CGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPL VCHTGPGEAGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	200	HCJB-C- бета (S76C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALQDSRYALCSRLRVSATFW QNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Дизайн_3_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C ys11	LC	201	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (A13C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLCPPIMLLVDGKQQMVV VCLVLDVAPPGLDSPWFSAAGQSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPL VCHTGPGEAGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	202	HCJB-C- бета (F13C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVCEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVST TDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

				REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Дизайн_4_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C ys12	LC	201	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (A13C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLCPPIMLLVDGKQQMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLSEELASWEPL VCHTGPGEAGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	203	HCJB-C- бета (S16C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPCEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Дизайн_5_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C ys13	LC	204	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (S11C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGKQQMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLSEELASWEPL VCHTGPGEAGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	203	HCJB-C- бета (S16C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPCEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

				HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
Дизайн_6_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C ys14	LC	204	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (S11C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGKQMMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPL VCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	205	HCJB-C- бета (A18C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSECEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_7_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C ys15	LC	204	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (S11C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGKQMMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPL VCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	206	HCJB-C- бета (E19C)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEACISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ

			(N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_8_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C us1_4L4 Т_1	LC	207	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (S62C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQMMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPCPATDGTWTNLAHLSLSEELASWEPL VCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	208	HCJB-C- бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWSVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_9_Пре_Т CR_обл асть соедине ния'1_C	LC	209	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (T65C) (N50Q)	KPTGVGGTFFPSLAPPIMLLVDGKQMMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPSPACDGTWTNLAHLSLSEELASWEPL VCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART

ys2_4L4 T_2	HC	208	HCJB-C- бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Дизайн_10_Пре_Т_об_ласть_соединения'1_С_ус4	LC	210	VL(CD3) -LCJB- C-пре- альфа (I16C) (N50Q)	KPTGVGGTTPPSLAPPCMLLVDGKQQMVV VCLVLDVAPPGLDSPIWFSAAGQGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLSEELASWEPL VCHTGPAGAEHRSRSTQPMHLSGEASTART
	HC	211	HCJB-C- бета (A11C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	LEDLKNVFPPEVCVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Пре-Т_Ди_зайн_5_	Легкая	212	VL(CD3) -HCJB- C-бета	KLEDLKNVFPPEVAVFEPCEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGV STDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF

перекрестный_1			(N69Q, S16C)-CJ'1G	WQNPRNHRCVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRA
	Тяжелая (область соединения в большей степени принадлежит жит антители)	213	HCJC-C-пре-альфа (S11C, N50Q)-CJ'2G1-Fc	SSASGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGKQMV VVCLVDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAF TYGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEP LVCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTART SDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Пре-TCR_Ди зайн_5_ перекрестный_2	Легкая	212	VL(CD3) -HCJB- C-бета (N69Q, S16C)-CJ'1G	KLEDLKNVFPPEVAVFEPCEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV STDQPPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNPRNHRCVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRA
	Тяжелая (область соединения в большей степени принадлежит пре-TCR)	214	HCJD-C-пре-альфа (S11) -CJ'2G1-Fc	SSPTGVGGTFFPCLAPPIMLLVDGKQMV VCLVDVAPPGLDSPIWFSAGQGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPL VCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTS DKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Пре-TCR_Ди	Легкая	215	VL(CD3) -LCJC-	KLEDLKNVFPPEVAVFEPSECEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVS

зайн_6_перекрестный_1			C-бета (A18C, N69Q)	TDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRA
	Тяжелая (область соединени я в большей степени принадле жит антителу)	213		
Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_2	Легкая	215		KLEDLKNVFPPEVAVFEPSECEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVS TDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFW QNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRA
	Тяжелая (область соединени я в большей степени принадле жит TCR)	214		
Дизайн Дельта-Гамма	Название цепи	SEQ ID NO		Последовательности
dg_Дизайн_2_без_гликозилирования	LC	215	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (N16Q+ N79Q)	EPRSQPHTKPSVFMKQGTNVACLKVEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE
	HC	216	HCJ5-C- гамма-	TDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNLILGSQEGN

			CJ'3G1- Fc(G1) (N65Q)	TMKTQDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_ху реCys1_ без_гли козилир ования	LC	217	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (N16C) (N79Q)	EPRSQPHTKPSVFMKCGTNVACLKVEFY KDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVK LGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE
	HC	218	HCJ5-C- гамма (T12C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPCIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNLILGSQEGN TMKTQDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_ху реCys2_ без_гли козилир ования	LC	219	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (V50C) (N16Q+ N79Q)	EPRSQPHTKPSVFMKQGTNVACLKVEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAVK KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE
	HC	220	HCJ5-C- гамма	TDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNLILGSCEGN

			(Q57C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TMKTQDTYMKFSWLTVPPEESLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_ху реCys3_ без_гли козилир ования	LC	221	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (D46C) (N16Q+ N79Q)	EPRSQPHTKPSVFMKQGTNVACLKVEFY PKDIRINLVSSKKITEFCPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE
	HC	222	HCJ5-C- гамма (M62C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNTILGSQEGN TCKTQDTYMKFSWLTVPPEESLDKEHRCIVR HENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_Су s2_без_г ликозил ировани я	LC	223	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (F12C) (N16Q+ N79Q)	EPRSQPHTKPSVCMKQGTNVACLKVEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE

	HC	224	HCJ5-C- гамма (S17C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPCIAETKLQKAGT YLCLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSQEG NTMKTQDTYMKFSLTVPEESLDKEHRCI VRHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_Су s1_без_г ликозил ировани я	LC	225	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (M14C) (N16Q+ N79Q)	EPRSQPHTKPSVFCVCKQGTNVAACLKVEFYF KDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVK LGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE
	HC	226	HCJ5-C- гамма (F14C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTICLPSIAETKLQKAGT YLCLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSQEG NTMKTQDTYMKFSLTVPEESLDKEHRCI VRHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_Су s3_без_г ликозил ировани	LC	223	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (F12C) (N16Q+	EPRSQPHTKPSVCMKQGTNVAACLKVEFYF PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVK KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDFE

я			N79Q)	
	HC	227	HCJ5-C- гамма (E20C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSIACKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNTILGSQEGN TMKTQDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_Су s4_без_г ликозил ировани я	LC	228	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта (F87C) (N16Q+ N79Q)	EPRSQPHTKPSVFMKQGTNVACLKVEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDCE
	HC	229	HCJ5-C- гамма (A19C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSICETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNTILGSQEGN TMKTQDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2_Су s5_без_г	LC	230	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта	EPRSQPHTKPSVFMKQGTNVACLKVEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDCE

ликотил ировани я			(E88C) (N16Q+ N79Q)	
	HC	229	HCJ5-C- гамма (A19C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSICETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNLILGSQEGN TMKTQDTYMKFSLWLVPEESLDKEHRCIV RHENKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_2	LC	231	VL(CD3) -LCJ5-C- дельта	EPRSQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVKEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDNKTVHSTDFE
	HC	232	HCJ5-C- гамма- CJ'3G1- Fc(G1)	TDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNLILGSQEGN TMKTNDTYMKFSLWLVPEESLDKEHRCIV RHENKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCPPCA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_Диза йн_1	LC	233	VL(CD3) -LCJ4-C- дельта	KPRSQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVKEFY PKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV KLGKYEDSNSVTCSVQHDNKTVHSTDFE
	HC	234	HCJ4-C- гамма-	SSASLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKIHWQEKKSNLILGSQEGN

			CJ3G1- Fc(G1)	TMKTNDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKSDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
dg_пере крестны й_Дизай н_1	LC	235	VL(CD3) -LCJ6-C- гамма	KDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGT YLCLLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSCEG NTMKTQDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCI VRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMD
	HC	236	HCJ6-C- дельта- CJ4G1- Fc(G1)	<u>SSRSQPHTKPSVFVMKQGTNVACLVKEFY</u> <u>PKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAV</u> <u>KLKGYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDEPK</u> SCDKTHTCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
dg_пере крестны й_Дизай н_2	LC	237	VL(CD3) -LCJ7-C- гамма	KDKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGT YLCLLEKFFPDVIKIHWEKKSNTILGSCEG NTMKTQDTYMKFWSLTVPEESLDKEHRCI VRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMD
	HC	238	HCJ7-C- дельта- CJ4G1- Fc(G1)	<u>EPRSQPHTKPSVFVMKQGTNVACLVKEFY</u> <u>PKDIRINLVSSKKITEFDPAICISPSGKYNAV</u> <u>KLKGYEDSNSVTCSVQHDQKTVHSTDEPK</u> SCDKTHTCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
				VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Таблица 20

Последовательности примеров полипептидных комплексов

Дизайн Альфа- Бета	Название цепи	SEQ ID NO		Последовательности
ТЗ- Дизайн_1 (IgG1) нормальн ый	LC	1	VL(CD3)- LCJ1-C- альфа (T49C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKR TVAAPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDVYITDKCVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	2	VH(CD3)- HCJ1-C-бета (S56C)- CJ1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVSSASKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQNP RNHFRCVQVF YGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP

				KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_2 (IgG1) нормальн ый	LC	3	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPLLIIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVQSJK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	4	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQNPРНHFRСVQVQF

				YGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRASDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
ТЗ- Дизайн_5 (IgG1) нормальн ый	LC	1	VL(CD3)- LCJ1-C- альфа (T49C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTEFGGGTKVEIKR TVAAPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQS KSDSVYITDKCVLDMRSM DFKSN SAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	5	VH(CD3)- HCJ1-C-бета (S56C)(FG- DE+)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVSSASKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW

				<p>WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQNPRNHFRQVQF YPSNQIVSAEAWGRASDK THTCPPCAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYTLF PSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLS PGK</p>
Т3- Дизайн_6 (IgG1) нормальн ый	LC	3	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C)	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESS</p>
	HC	6	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C)(FG- DE+)- CJ'1G1- Fc(G1)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTTA DKSTSTAYMELSSLRSEDV AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVLEDLKLVFP</p>

				PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQNPРНFRCVQF YPSNQIVSAEAWGRASDK THTCPPCAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPVYVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSKCS VMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
Т3- Дизайн_6а (IgG1) нормальн ый	LC	3	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPVAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	7	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C)(FG- DE)- CJ1G1-	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED

			Fc(G1)	AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPHVLSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQ--SG-- RYALSSRLRVSATFWQNP RNHFRCVQFYPSNQIVSA EAWGRASDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
Т3- Дизайн_3 (IgG1) перекрестный	LC	8	VL(CD3)- LCJ3-C-бета (S56C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKL EDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSG VCTDPQPLKEQPALNDSR YALSSRLRVSATFWQNPR NHFRVCVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTVQIVSAEAWG RA

	HC	9	VH(CD3)- HCJ3-C- альфа (T49C)- CJ'2G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVSSASIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYIT DKCVLDMRSMDFKNSA VAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPSSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_4 (IgG1) перекрестный	LC	8	VL(CD3)- LCJ4-C-бета (S56C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPELLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRFTGGGKVEIKL EDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWVNGKEVHSG VCTDPQPLKEQPALNSR

				YALSSRLRVSATFWQNPR NHFRCVQVFYGLSENDEW TQDRAKPVVTQIVSAEAWG RA
	HC	10	VH(CD3)- HCJ4-C- альфа (T49C)- CJ'2G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVSSPDIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYIT DKCFLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFPSPSSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLPPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_7 (IgG1) перекрестн ый	LC	11	VL(CD3)- LCJ3-C-бета (S56C)(FG- DE+)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKL

				EDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWVWNGKEVHSG VCTDPQPLKEQPALNSR YALSSRLRVSATFWQNPR NHFRQVQFYPSNQIVSAE AWGRA
	HC	9	VH(CD3)- HCJ3-C- альфа (T49C)- CJ'2G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVSSASIQNPD AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPSSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_8 (IgG1)	LC	11	VL(CD3)- LCJ4-C-бета (S56C)(FG-	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW

перекрестный			DE+)	ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKL EDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWVWNGKEVHSG VCTDPQPLKEQPALNDSR YALSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYPSNQIVSAE AWGRA
	HC	10	VH(CD3)- HCJ4-C- альфа (T49C)- CJ'2G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPKGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVSSPDIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVQS KSDSVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFAFANAFNNS IIPEDTFFPSPSSDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK

Т3- Дизайн_2- QQQQ (IgG1)	LC	12	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N68Q + N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSQKSDFACA NAFQNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	13	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKCASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPVNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSK

				LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_2- АААА (IgG1)	LC	14	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34A+N68A + N79A)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRSGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTAVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSAKSDFACA NAFANSIIPEDTFFPSPESS
	HC	15	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C) (N69A)- CJ1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALADSRVALSSRLRV SATFWQNPРНFRCVQVF YGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRASDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS

				REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_2- QSKE (IgG1)	LC	16	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N68S + N79K)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLRLTFGGGKVEIKP DIQNPDPVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSSKSDFACA NAFKNSIIPEDTFFSPPESS
	HC	17	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C) (N69E)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALEDTRYALSSRLRV SATFWQNPVNHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPV QIVSAEAWGRASDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST

				YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
T3- Дизайн_2- ASKE (IgG1)	LC	18	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34A+N68S +N79K)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGKVEIKP DIQNPDPVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTAVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSSKSDFACA NAFKNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	17	VH(CD3)- HCJ2-C-6era (S56C)(N69E)-CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALEDSTRYALSSRLRV SATFWQNPVNHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPV QIVSAEAWGRASDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPP

				KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_2- QQQQQ (IgG1)	LC	19	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N68Q +N79Q+ N61Q)	DIVMTQSPDRLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGST DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLTRTFGGGKVEIKP DIQNPDAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSQSAVAWSQKSDFA NAFQNSHIPEDTFFPSP
	HC	20	VH(CD3)- HCJ2-C-βera (S56C) (N69Q)- CJ1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPVNHFRFCQVQ

				FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Т3- Дизайн_2- QQQQ (IgG4)	LC	12		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSQKSDFA NAFQNSIHPEDTFFPSP
	HC	21	VH(CD3)- HCJ2-C-6era (S56C) (N69Q)- CJ'1G4- Fc(G4)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW

				<p>WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHRCQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKLSLSLGGK</p>
E17- Дизайн_2- QQQQ (IgG1)	T3-LC	12	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N68Q + N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSQKSDFACA NAFQNSIIPEDTFFPSPSS
	T3-HC	22	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1) (выступ)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLLVTVLEDLKNVFP

				PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPC REEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDFLYSK LTVDKSRWQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
	U4-LC	23	VL(CD19)- CL	DIQLTQSPSFLSASVGDRV TITCSASSTVNYMHWYQQ KPGKAPKLLIYSTSNLASG VPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCHQWSSYP YTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
	U4-HC	24	VH(CD19)- CH1-Fc(G1) (впадина)	QMQLVQSGPEVKKPGTSV KVSCKASGYAFTSYNMY WVRQARGQRLEWIGYIDP

				YNGDTTYNQKFKGRVTIT RDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCLTTAYAMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVCTL PPSREEMTKNQVLSLCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
E17- Дизайн_2- QQQQ (IgG4)	T3-LC	12	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N68Q +N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP DIQNPDPVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSQKSDFAA NAFQNSIIPEDTFFPSPESS
	T3-HC	25	VH(CD3)- HCJ2-C-βeta	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW

			(S56C) (N69Q)- CJ'1G4- Fc(G4) (выступ)	VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPРНHFRСQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRYGPСPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK
	U4-LC	23	VL(CD19)- CL	DIQLTQSPSFLSASVGDRV TITCSASSTVNYMHWYQQ KPGKAPKLLIYSTSNLASG VPSRFSGSGSTEFTLTISS LQPEDFATYYCHQWSSYP YTFGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVT

				KSFNRGEC
	U4-HC	26	VH(CD19)- CH1-Fc(G4) (впадина)	QMQLVQSGPEVKKPGTSV KVSCKASGYAFTSYNMY WVRQARGQRLEWIGYIDP YNGDTTYNQKFKGRVTIT RDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCLTTAYAMDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPP SQEEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLVSR LTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSL GK
F16- Дизайн_2- QQQQ (IgG4)	T3-LC	12		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD

				FKSNSAVAWSQKSDFACA NAFQNSIIPEDTFFPSPSS
T3-HC	25			QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSD EDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK
U4-LC	23	VL(CD19)- CL		DIQLTQSPSFLSASVGD TITCSASSTVNYMHWYQQ KPGKAPKLLIYSTSNLASG VPSRFSGGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCHQWSSYP YTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVV

				CLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
	U4-HC	27	VH(CD19)- CH1- спейсер- VH(CD19)- CH1-Fc(G4) (впадина)	QMQLVQSGPEVKKPGTSV KVSCKASGYAFTSYNMY WVRQARGQRLEWIGYIDP YNGDTTYNQKFKGRVTIT RDMSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCLTTAYAMDYWG QGTTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVGGGGS GGGGSQMLVQSGPEVKK PGTSVKVSCKASGYAFTSY NMYWVRQARGQRLEWIG YIDPYNGDTTYNQKFKGR VTITRDMSTSTAYMELSSL RSED TAVYYCLTTAYAMD YWGQGTTLVTVSSASTKGP SVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSI

				EKTISKAKGQPREPQVCTL PPSQEEMTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLV SRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
Fc-IgG1 (выступ)		304		SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
Fc-IgG4 (выступ)		305		SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGLK
T3-Fab- Дизайн_2.h is1	LC	3	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGSGT

				DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLTRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	28	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C)област ь соединения'	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGFAFTDYIHW VRQAPQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQNPРНFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGR
Т3-Fab- Дизайн_2.h is2	LC	3		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLTRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESS
	HC	29	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C)област	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGFAFTDYIHW VRQAPQGLEWMGWISPG

			ь соединения'	NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALNDSRYALSSRLRV SATFWQNPRNHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRAD
Т3-Fab- Дизайн_2- QQQ.his1	LC	12	VL(CD3)- LCJ2-C- альфа (T49C) (N34Q+N68Q +N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGGT DFTLTISLQAEDVAVYYC TQSHLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSM FKSNSAVAWSQKSDFACA NAFQNSIIPEDTFFPSPSS
	HC	30	VH(CD3)- HCJ2-C-бета (S56C) (N69Q)-His1	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV

				TQIVSAEAWGR
Т3-Fab- Дизайн_2- QQQ.his2	LC	12		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP DIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSQKSDFACA NAFQNSIIPEDTFFPSPSS
	HC	31	VH(CD3)- HCJ2-C-βera (S56C) (N69Q)-His2	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRAD
C-βera	C-βera_1_noCys	32	C-βera (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQVQFY GLSENDEWTQDRAKPV IVSAEA
	C-βera_1	33	C-βera (S56C)	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWW

			(C74A)	VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVQTQ IVSAEA
C-6era_1-Q	34	C-6era (S56C) (N69Q) (C74A)		EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVQTQ IVSAEA
C-6era_1-A	35	C-6era (S56C) (N69A) (C74A)		EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALADSRALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVQTQ IVSAEA
C-6era_1-E	36	C-6era (S56C) (N69E) (C74A)		EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALEDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVQTQ IVSAEA
C-6era_2	37	C-6era (S56C)(FG-) (C74A)		EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY PSN-----QIVSAEA
C-6era_2-Q	38	C-6era (S56C) (N69Q) (FG-)		EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK

			(C74A)	EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQVQFY PSN-----QIVSAEA
	C-бета_2-A	39	C-бета (S56C) (N69A) (FG-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALADSRALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQVQFY PSN-----QIVSAEA
	C-бета_2-E	40	C-бета (S56C) (N69E) (FG-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALEDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQVQFY PSN-----QIVSAEA
	C-бета_3	41	C-бета (S56C)(FG- DE-) (C74A)	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLK EQ---S- GRYALSSRLRVSATFWQN PRNHFRQVQFYPSN----- -----QIVSAEA
С-альфа	C-альфа_1_noCys	42	С-альфа	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESP
	C-альфа_1	43	С-альфа (T49C)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPESP
	C-альфа_1-QQQ	44	С-альфа (T49C) (N34Q+N68Q)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTQVSQSKSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA

			+ N79Q)	VAWSQKSDFACANAFQNS IIPEDTFFPSPESS
	C-альфа_1-AAA	45	C-альфа (T49C) (N34A+N68A + N79A)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTAVSQSKDSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSAKSDFACANAFANS IIPEDTFFPSPESS
	C-альфа_1-QSK	46	C-альфа (T49C) (N34Q+N68S + N79K)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTQVSQSKDSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSSKSDFACANAFKNS IIPEDTFFPSPESS
	C-альфа_1-ASK	47	C-альфа (T49C) (N34A+N68S + N79K)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTAVSQSKDSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSNSA VAWSSKSDFACANAFKNS IIPEDTFFPSPESS
	C-альфа_1- QQQQ	48	C-альфа (T49C) (N34Q+N68Q + N79Q+N61Q)	AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTQVSQSKDSDVYIT DKCVLDMRSMDFKSQSA VAWSQKSDFACANAFQNS IIPEDTFFPSPESS
Область соединения X	H_область соединения_1	49	VH-C- бетаCJ1	SSASKNVFPP
	H_область соединения_2	50	VH-C- бетаCJ2	LEDLKNVFPP
Область соединения Z	L_область соединения_1	51	VL-C- альфаCJ1	KRTVAAPDP
	L_область соединения_2	52	VL-C- альфаCJ2	KPDIQNPDP
Область соединения 'Y	область соединения'_IgG 1	53	C-бета- область соединения'(IgG1)CJ1	WGRASDKTHTCPPCAPE AAGGP

	область соединения'_1 rG4	54	С-бета- область соединения'(IgG4)CJ1	WGR--- YGPPCPPCPAPEFLGGP
		307		FE
		308	VH-С- бетаCJ2	KLEDLKNVFPP
		309	VL-С-пре- альфа-СJB	KPTGVGGTP
		306	С-конец (перекрестны й С-конец легкой цепи)	WGRA
Дизайн Пре- альфа- Бета	Название цепи	SEQ ID NO		Последовательности
Дизайн_1_ Пре_TCR_ область соединения '1	LC	64	VL(CD3)- LCJB-С-пре- альфа (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTITISLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP TGVGGTPEFSLAPPIMLLV DGKQMQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGPSATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE A*START
	HC	65	VH(CD3)- HCJB-С-бета (N69Q)- CJ'1G1-	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA

			Fc(G1)	DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPРНHFRСQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_2_ Пре_TCR_ область соединения '1_Cys10	LC	66	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (Y59C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFSGSGGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP TGVGGTPEPFLAPPIMLLV DGKQMQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTCGSPATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE

				ASTART
	HC	67	VH(CD3)- HCJB-C-βera (S76C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALCSRLR VSATFWQNPРНHFRСQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_3_ Пре_TCR_ область соединения '1_Cys11	LC	68	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (A13C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP TGVGGTPEPFLCPPIMLLV

				DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPIWFSAGQGSALDA FTYGPSPATDGTWNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE ASTART
	HC	69	VH(CD3)- HCJB-C-6era (F13C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVLVLEDLKNVFP PEVAVCEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_4_ Пре_TCR_	LC	68	VL(CD3)- LCJB-C-пре-	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY

область соединения '1_Cys12			альфа (A13C) (N50Q)	LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP <u>TGVGGTTPFPSL</u> CPPIMLLV DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGPSPATDGTWNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE ASTART
	HC	70	VH(CD3)- HCJB-C- δ era (S16C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPCEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPVNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVHLQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSK

				LTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_5_ Пре_TCR_ область соединения *1_Cys13	LC	71	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (S11C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP TGVGGTPFPCLAPPIMLLV DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGPSATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE ASTART
	HC	70	VH(CD3)- HCJB-C-βera (S16C) (N69Q)- CJ*1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVITTA DKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPCEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPVNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG

				KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_6_ Пре_TCR_ область соединения '1_Cys14	LC	71	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (S11C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP <u>TGVGGTPEPCLAPPIMLLV</u> DGKQMQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAAGQGSALDA FTYGPSPATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE Astart
	HC	72	VH(CD3)- HCJB-C-бета (A18C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSECEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT

				CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_7_ Пре_TCR_ область соединения '1_Cys15	LC	71	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (S11C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQKQPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP <u>TGVGGT</u> PPFCLAPPIMLLV DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGSPATDGTWNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE ASTART
	HC	73	VH(CD3)- HCJB-C-βera (E19C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEACISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW

				WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_8_ Пре_TCR_ область соединения 'I_Cys1_4L 4T_1	LC	74	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (S62C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP TGVGGTPEPSLAPPIMLLV DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGPCPATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE ASTART
	HC	75	VH(CD3)- HCJB-C-бета (S56C) (N69Q)-	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA

			CJ1G1- Fc(G1)	DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн 9_ Пре_TCR_ область соединения 1_Cys2_4L 4T_2	LC	76	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (T65C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGGT DFLTITISLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP TGVGGTPEPSLAPPIMLLV DGKQMQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAGQGSALDA FTYGPSACDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE

				ASTART
	HC	75	VH(CD3)- HCJB-C-βera (S56C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_10 _Пре_TCR _область соединения '1_Cys4	LC	77	VL(CD3)- LCJB-C-пре- альфа (I16C) (N50Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP TGVGGTPEPPLAPPCELLV

				DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPIWFSAGQGSALDA FTYGSPATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE Astart
	HC	78	VH(CD3)- HCJB-C-βera (A11C) (N69Q)- CJ'1G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVCFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPRNHRCQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRASDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVHLQDNLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Дизайн_11 _Пре_TCR	LC	58		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY

_область соединения '2_С-конец			LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIKP <u>TGVGGTTPFSLAPPIMLLV</u> DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGSPATDGTWTNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE <u>ASTARTCPQEPLRGTPGG</u>
	HC	79	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPVNHFRQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCDKTH TCPPEAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK

				LTVDKSRWQQGNVFCV MHEALHNHYTQKSLSP GK
Дизайн_12 _Пре_TCR _область соединения '3_C	LC	63		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGGT DFLTISLQAEDVAVYYC TQSHLTRTFGGGKVEIKP TGVGGTPFPSLAPPIMLLV DGKQQMVVVCLVLDVAP PGLDSPWFSAQGSALDA FTYGSPATDGTWNLAH LSLPSEELASWEPLVCHTG PGAEGHSRSTQPMHLSGE ASTARTC
	HC	80		QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLR VSATFWQNPFRHFRCQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTS VCPPEAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLN

				GKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Область соединения W	L_область соединения_3	81	VL-C-пре- альфа-CJB	PTGVGGTP
С-пре- альфа	С-пре-альфа	82		FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGNGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART
	С-пре-альфа-без гликозирования (Дизайн 1)	83	(N50Q)	FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART
	С пре альфа без гликозирования я-Cys (Дизайн 2)	311	(N50Q, Y59C)	FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTCGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART
	С-пре-альфа-без гликозирования я-Cys (Дизайн 3)	312	(N50Q, A13C)	FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART

С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 4)	312	(N50Q, A13C)	
С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 5)	313	(N50Q, S11C)	FPCLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART
С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 6)	313	(N50Q, S11C)	
С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 7)	313	(N50Q, S11C)	
С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 8)	314	(N50Q, S62C)	FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPC PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART
С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 9)	315	(N50Q, T65C)	FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PACDGTWTNLAHLSLPSE ELASWEPLVCHTGPGAEG HSRSTQPMHLSGEASTART
С-пре-альфа-без гликозилировани я-Сус (Дизайн 10)	316	(N50Q, I16C)	FPSLAPPIMLLVDGKQQM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTART
С-пре-альфа-без	317	(N50Q,	FPSLAPPIMLLVDGKQQM

	гликозилированы (Дизайн 11)		концевые остатки)	VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTARTC PQEPLRGTPGG
	С-пре-альфа-без гликозилированы (Дизайн 12)	318	(N50Q, только С- конец)	FPSLAPPIMLLVDGKQMM VVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLPSEE LASWEPLVCHTGPGAEGH SRSTQPMHLSGEASTARTC
С- бета_for_С -пре-альфа	С-бета_for_Пре- альфа	84	N69Q	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEA
	Дизайн_1	84	N69Q	
	Дизайн_2	319	N69Q, S76C	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALCSRLRV SATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEA
	Дизайн_3	320	N69Q, F13C	EVAVCEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEA

Дизайн_4	321	N69Q, S16C	EVAVFEPCEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQ IVSAEA
Дизайн_5	321	N69Q, S16C	
Дизайн_6	322	N69Q, A18C	EVAVFEPSECEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQ IVSAEA
Дизайн_7	323	N69Q, E19C	EVAVFEPSEACISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQ IVSAEA
Дизайн_8	34	N69Q, S56C	
Дизайн_9	34	N69Q, S56C	
Дизайн_10	324	N69Q, A11C	EVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYDPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALQDSRYALSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQ IVSAEA
Дизайн_11	84	N69Q	
Дизайн_12	84	N69Q	

Дизайн Дельта- Гамма	Название цепи	SEQ ID NO		Последовательности
dg_Дизайн _2_без_гли козилиров ания	LC	85	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVFMKQGTN VACLVKEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	86	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма- CJ'3G1- Fc(G1) (N65Q)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNTILGSQEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPPEESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIIFFPIKSDKTHTCP PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSINKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA

				VEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_нуреСус 1_без_глик озилирова ния	LC	89	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (N16C) (N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGKVEIEP RSQPHTKPSVFMKCGTN VACLVKEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	90	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (T12C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLLVTVTDKQLDAD VSPKPCIFLPSIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNLILGSGEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIFFPIKSDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSINKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT

				KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_нуреСус 2_без_глик озилирова ния	LC	91	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (V50C) (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTITSSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVFMKQGTN VACLVKEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAICISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	92	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (Q57C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTTA DKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKIH QEKKSNITLGSEGNMTKT QDTYMKFSWLTVPESLD KEHRCIVRHENKNGVDQ EIIFFPIKSDKTHTCPPCAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKG

				QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_нуреСус 3_без_глик озилирова ния	LC	93	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (D46C) (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTLISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVFMKQGTN VACLKVEFYPKDIRINLVS SKKITEFCPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	94	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (M62C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNLILGSQEGNTCKT QDTYMKFSWLTVPESLD KEHRCIVRHENKNGVDQ EIIFFPIKSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCK

				VSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_Сус2_бе з_гликозил ирования	LC	95	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (F12C) (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRITFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVCMKQGTN VACLKVEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	96	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (S17C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPCIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNTILGSQEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIIFFPIKSDKTHTCP PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS

				VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_Сус1_бе з_гликозил ирования	LC	97	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (M14C) (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVFCVCKQGTN VACLKVEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	98	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (F14C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVVTDKQLDAD VSPKPTICLPSIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNTILGSQEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIIFFPIKSDKTHTCP PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDV DPEVKFNWYVDGVEVHN

				AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_Сус3_бе з_гликозил ирования	LC	95	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (F12C) (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFLTISLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVCMKQGTN VACLVKEFYKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDFE
	HC	99	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (E20C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSIACTKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNTILGSQEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPPEESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIIFFPIKSDKTHTCP PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE

				DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2_Сус4_бе з_гликозил ирования	LC	100	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (F87C) (N16Q+N79Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLRLRFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVFMKQGTN VAQLVKEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDCE
	HC	101	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (A19C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSKKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSICETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKHW QEKKSNTILGSQEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIIFFPIKSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDT

				<p>LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>
dg_Дизайн _2_Сус5_бе з_гликозил ирования	LC	102	<p>VL(CD3)- LCJ5-C- дельта (E88C) (N16Q+N79Q)</p>	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLRLTFGGGTKEIEP RSQPHTKPSVFMKQGTN VACLKVEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDQKTVHSTDFC</p>
	HC	101	<p>VH(CD3)- HCJ5-C- гамма (A19C) (N65Q)- CJ'3G1- Fc(G1)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSICETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKIH QEKKSNTILGSQEGNTMK TQDTYMKFSWLTVPESL DKEHRCIVRHENKNGVD QEIIFFPIKSDKTHTCP CPA</p>

				PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
dg_Дизайн _2	LC	105	VL(CD3)- LCJ5-C- дельта	DIVMTQSPDRLAVSLGERA TINCKSSQSLNLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHLTRTFGGGTKVEIEP RSQPHTKPSVFMKNGTN VACLKVEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDNKTIVHSTDFE
	HC	106	VH(CD3)- HCJ5-C- гамма- CJ ³ G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDY AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGTLVTVTDKQLDAD VSPKPTIFLPSIAETKLQKA GTYLCLLEKFFPDVIKIH QEKKSNLILGSEGTMTK TNDTYMKFSWLTVPESL DKEHRCIVRHENKNGVD

				QEIIFFPIKSDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCVMHEAL HNHYTQKLSLSPGK
dg_Дизайн _1	LC	107	VL(CD3)- LCJ4-C- дельта	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQKQPGQPPELLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGGT DFTLTISLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKP RSQPHTKPSVFMKNGTN VACLVKEFYPKDIRINLVS SKKITEFDPAIVISPSGKYN AVKLGKYEDSNSVTCSVQ HDNKTVHSTDFE
	HC	108	VH(CD3)- HCJ4-C- гамма- CJ'3G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVN'TKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVSSASLDADV SPKPTIFLPSIAETKLQKAG TYLCLLEKFFPDVIKIHQ EKKSNTILGSQEGNTMKT NDTYMKFSWLTVPPEESLD

				KEHRCIVRHENNKNGVDQ EIIFFPIKSDKTHTCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
dg_перекрестный_Дизайн_1	LC	109	VL(CD3)- LCJ6-C- гамма	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQKQPGQPPELLIYW ASTRQSGVPRFSGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTRFGGGTKVEIKD KQLDADVSPKPTIFLPSIAE TKLQKAGTYLCLLEKFFPD VIKIHWEKKSNTILGSCE GNTMKTQDTYMKFSWLT VPEESLDKEHRCIVRHENN KNGVDQEIIFFPIKTDVITM D
	HC	110	VH(CD3)- HCJ6-C- дельта- C γ 4G1- Fc(G1)	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGGGLEWGMWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTVSSRSQPHTK PSVFMKQGTNVAQLVKE

				<p>FYPKDIRINLVSSKKITEFD PAICISPSGKYNAVKLGKY EDSNSVTCSVQHDQKTVH STDEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>
dg_перекрестный_Дизайн_2	LC	111	VL(CD3)- LCJ7-C- гамма	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVDPDRFSGSGGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKD KQLDADVSPKPTIFLPSIAE TKLQKAGTYLCLLEKFFPD VIKIHWEKKSNTILGSCE GNTMKTQDTYMKFSWLT VPEESLDKEHRCIVRHENN KNGVDQEIIFFPIKTDVITM D</p>
	HC	112	VH(CD3)- HCJ7-C- дельта- CJ'4G1- Fc(G1)	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY</p>

				<p>WGQGLVTVVEPRSQPHTK <u>PSVFVMKQGTNVACLVKE</u> <u>FYPKDIRINLVSSKKITEFD</u> <u>PAICISPSGKYNAVKLGKY</u> <u>EDSNSVTCSVQHDOKT VH</u> <u>STDEPKSCDKTHTCPPCPA</u> PEAAGGPSVFLFPPPKD LMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKALPAIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPP VLDS DGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p>
С-гамма	С-гамма_1	113	С-гамма	<p>KPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKHWQEK KSNTILGSQEGNTMKTND TYMKFSWLTVPPEESLDKE HRCIVRHENNKNGVDQEII F</p>
	С- гамма_1_без_гли козилирования	114	С-гамма (N65Q)	<p>KPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLLEKFFPDVIKHWQEK KSNTILGSQEGNTMKTQD TYMKFSWLTVPPEESLDKE HRCIVRHENNKNGVDQEII F</p>
	dg_Дизайн_1	113	Без мутаций	
	dg_Дизайн_2	113	Без мутаций	
	dg_Дизайн_2_без з_гликозилирова ния	114	N65Q	

dg_Дизайн_2_hy peCys1_без_глик озилирования	333	N65Q, T12C	KPCIFLPSIAETKLQKAGTY LCLEKFFPDVIKIHWQEK KSNTILGSQEGNTMKTQD TYMKFSWLTVPESLDKE HRCIVRHENKNGVDQEII F
dg_Дизайн_2_hy peCys2_без_глик озилирования	334	N65Q, Q57C	KPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLEKFFPDVIKIHWQEK KSNTILGSCEGNTMKTQD TYMKFSWLTVPESLDKE HRCIVRHENKNGVDQEII F
dg_Дизайн_2_hy peCys3_без_глик озилирования	335	N65Q, M62C	KPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLEKFFPDVIKIHWQEK KSNTILGSQEGNTCKTQDT YMKFSWLTVPESLDKEH RCIVRHENKNGVDQEIIIF
dg_Дизайн_2_Су s2_без_гликозил ирования	336	N65Q, S17C	KPTIFLPCIAETKLQKAGT YLACLEKFFPDVIKIHWQE KKSNTILGSQEGNTMKTQ DTYMKFSWLTVPESLD- KEHRCIVRHENKNGVDQ EIIIF
dg_Дизайн_2_Су s1_без_гликозил ирования	337	N65Q, F14C	KPTICLPSIAETKLQKAGT YLACLEKFFPDVIKIHWQE KKSNTILGSQEGNTMKTQ DTYMKFSWLTVPESLDK EHRCIVRHENKNGVDQEI IF
dg_Дизайн_2_Су s3_без_гликозил ирования	338	N65Q, E20C	KPTIFLPSIACTKLQKAGTY LCLEKFFPDVIKIHWQEK KSNTILGSQEGNTMKTQD TYMKFSWLTVPESLDKE HRCIVRHENKNGVDQEII F

	dg_Дизайн_2_Су s4_без_гликозил ирования	339	N65Q, A19C	KPTIFLPSICETKLQKAGTY LCLEKFFPDVIKIHWQEK KSNTILGSQEGNTMKTQD TYMKFWSLTVPEESLDKE HRCIVRHENNKNGVDQEII F
	dg_Дизайн_2_Су s5_без_гликозил ирования	339	N65Q, A19C	
	dg_перекрестны й_Дизайн_1	340		KPTIFLPSIAETKLQKAGTY LCLEKFFPDVIKIHWQEK KSNTILGSCEGNTMKTQD TYMKFWSLTVPEESLDKE HRCIVRHENNKNGVDQEII FPPIKTDVITMD
	dg_перекрестны й_Дизайн_2	340		
С-дельта	С-дельта_1	115	С-дельта	SVFVMKNGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDNKTVHS TDFE
	С- дельта_1_без_гли козилирования	116	С-дельта (N16Q+N79Q)	SVFVMKQGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDFE
		310	С-дельта	K SVFVMKNGTNAVCLVK EFYPKDIRINLVSSKKITEF DPAIVISPSGKYNAVKLGK YEDSNSVTCSVQHDNKTV HSTDFE
	dg_Дизайн_1	115	Без мутаций	
	dg_Дизайн_2	115	Без мутаций	

dg_Дизайн_2_без_гликозилирования	116	N16Q, N79Q	
dg_Дизайн_2_hyреCys1_без_гликозилирования	325	N16C, N79Q	SVFVMKCGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDFE
dg_Дизайн_2_hyреCys2_без_гликозилирования	326	N16Q, N79Q, V50C	SVFVMKQGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AICISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDFE
dg_Дизайн_2_hyреCys3_без_гликозилирования	327	N16Q, N79Q, D46C	SVFVMKQGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDFE
dg_Дизайн_2_Суs2_без_гликозилирования	328	N16Q, N79Q, F12C	SVFVMKQGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP PAIVISPSGKYNAVKLGKYE EDNSVTCSVQHDQKTVHS STDFE
dg_Дизайн_2_Суs1_без_гликозилирования	329	N16Q, N79Q, M14C	SVFVCKQGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDFE
dg_Дизайн_2_Суs3_без_гликозилирования	328	N16Q, N79Q, F12C	
dg_Дизайн_2_Суs4_без_гликозилирования	330	N16Q, N79Q, F87C	SVFVMKQGTNAVCLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE

				DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDCE
	dg_Дизайн_2_Су s5_без_гликозил ирования	331	N16Q, N79Q, E88C	SVFVMKQGTNVACLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TDFC
	dg_перекрестны й_Дизайн_1 (дельта в качестве тяжелой цепи)	332	N16Q, N79Q, V50C	SVFVMKQGTNVACLVKEF YPKDIRINLVSSKKITEFDP AICISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDQKTVHS TD--
	dg_перекрестны й_Дизайн_2 (дельта в качестве тяжелой цепи)	332		
Область соединения R	H_область соединения_4	117	HCJ4	SSASLDADVSP
	H_область соединения_5	118	HCJ5	TDKQLDADVSP
Область соединения T	L_область соединения_4	119	LCJ4	PRSQPHTKP
	L_область соединения_5	120	LCJ5	EPRSQPHTKP
Область соединения 'S	область соединения'3_Ig G1	121	CJ'3G1	PPIKSDKTHTCPPCPAPEAA GGP
	область соединения'3_1 rG4	122	CJ'3G4	PPI--- YGPCCPPCPAPEFLGGP
Область соединения H	H_область соединения_6	123	HCJ6	SSRSQPHTKP
	H_область	124	HCJ7	EPRSQPHTKP

	соединения_7			
Область соединения J	L_область соединения_6	125	LCJ6	KDKLDADVSP
	L_область соединения_7	126	LCJ7	TDKLDADVSP
Область соединения I	область соединения'4_Ig G1	127	CJ'4G1	EPKSSDKTHTCPPCPAPEA AGGP
	область соединения'4_1 rG4	128	CJ'4G4	ESK--- YGPPCPPCPAPEFLGGP
Область соединения (Альфа- Бета, перекрестн ый, в большей степени принадлеж ит антителу)	H_область соединения_3	129	HCJ3	SSASIQNPDP
	L_область соединения_3	50	LCJ3	
Область соединения (Альфа- Бета, перекрестн ый, в большей степени принадлеж ит TCR)	H_область соединения_4	130	HCJ4	SSPDIQNPDP
	L_область соединения_3	50	LCJ3	
Область соединения	Область соединения	131	LCJA	RTVAAGTP

(Пре- альфа- Бета, нормальн ый, в большей степени принадлеж ит антителу)	легкой цепи			
Область соединения (Пре- альфа- Бета, перекрестн ый, в большей степени принадлеж ит антителу)	Область соединения легкой цепи	50	LCJC	
	Область соединения тяжелой цепи	132	HCJC	SSASGVGGTP
Область соединения (Пре- альфа- Бета, перекрестн ый, в большей степени принадлеж ит TCR)	Область соединения легкой цепи	50	LCJD	
	Область соединения тяжелой цепи	133	HCJD	SSPTGVGGTP
Область соединения	Область соединения'	134	CJ'2G1	SDKTHTCPPCPAPEAAGGP

' (Альфа-Бета, Пре-альфа-Бета, crossed)	Область соединения'	135	CJ'2G4	--YGPPCPPCPAPEFLGGP
Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_1	Легкая	136	VL(CD3)-HCJB-C-6era (N69Q, S16C)-CJ'1G	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNLSRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDFRFGSGSGT DFTLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKL EDLKNVFPPEVAVFEPCEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQLKEQPALQDSRY ALSSRLRVSATFWQNP HFRQVQVYGLSENDEWT QDRAKPVTVQIVSAEAWGR A
	Тяжелая (область соединения в большей степени принадлежит антителу)	137	VH(CD3)-HCJC-C-пре-альфа (S11C, N50Q) - CJ'2G1- Fc	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVSSASGVGGT PFPCLAPPIMLLVDGKQQ MVVVCLVLDVAPPGLDSPI WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLSEE LASWEPLVCHTGPAGGH SRSTQPMHLSGEASTARTS DKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNW

				YVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Пре- TCR_Диза йн_5_пере крестный_ 2	Легкая	136	VL(CD3)- HCJB-C-бета (N69Q, S16C)-CJ'1G	
	Тяжелая (область соединения в большей степени принадлежит пре-TCR)	138	VH(CD3)- HCJD-C-пре- альфа (S11)- CJ'2G1- область соединения Fc	QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGQGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLTVTVSSPTGVGGT PFPCAPPIMLLVDGKQQ MVVVCLVLDVAPPGLDSP WFSAGQGSALDAFTYGPS PATDGTWTNLAHLSLSEE LASWEPLVCHTGPAGEGH SRSTQPMHLSGEASTARTS DKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLV

				KGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
Пре- TCR_Диза йн_6_пере крестный_ 1	Легкая	139	VL(CD3)- LCJC-C-βera (A18C, N69Q)	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLNSRTRKNY LAWYQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFLTISSLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGGTKVEIKL EDLKNVFPPEVAVFEPSEC EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALQDSRY ALSSRLRVSATFWQNPRN HFRQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGR A
	Тяжелая (область соединения в большей степени принадлежит антителу)	137		
Пре- TCR_Диза йн_6_пере крестный_ 2	Легкая	139		
	Тяжелая (область соединения в большей степени принадлежит TCR)	138		
Область соединения ' (альфа- бета,	IgG1	140	CJ'2G1	SDKTHTCPPCPAPEAAGGP

перекрестный, IgG1)				
Область соединения ' (альфа-бета, перекрестный, IgG4)	IgG4	141	CJ'2G4	YGPCCPPCPAPEFLGGP
Антитело против CD3 VH		300		QVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGFAFTDYYIHW VRQAPGGLEWMGWISPG NVNTKYNENFKGRVTTTA DKSTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDGYSLYYFDY WGQGLVTV
Антитело против CD3 VL		301		DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLLSNRTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRQSGVPDRFSGSGSGT DFLTISLQAEDVAVYYC TQSHTLRTFGGKVEI
Fc(G1)		302		SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQ DNLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
Fc(G4)		303		SVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDPEVQFN
				WYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQ DNLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK

Примеры

Пример 1. Дизайн и конструирование химерных белков антитела и TCR.

Последовательности TCR.

TCR являются гетеродимерными белками, состоящими из двух цепей. Приблизительно 95% T-клеток человека имеют TCR, состоящие из альфа- и бета-цепей, в то время как остальные 5% имеют TCR, состоящие из гамма- и дельта-цепей. Константная область альфа-цепи человека имеет только один ген TRAC. Константная область бета-цепи человека имеет два подкласса: гены TRBC1 и TRBC2. В Protein Data Bank (PDB) количество кристаллических структур TRBC1 относительно больше количества структур TRBC2, таким образом, последовательности TRBC1 выбирали в качестве основного остова для дизайна полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании ("WuXiBody"). Типичную аминокислотную последовательность TRBC1 можно найти в структуре PDB 4L4T.

Межцепочечная дисульфидная связь в TCR.

Кристаллическую структуру TCR использовали в качестве основы при дизайне WuXiBody. В отличие от нативного TCR, закоренного в мембране на поверхности Т-клетки, растворимые молекулы TCR являются менее стабильными, хотя его трехмерная структура очень похожа на антитело Fab. Фактически, нестабильность TCR в растворимом состоянии являлась значительным препятствием для выявления его кристаллической структуры (Wang 2014, выше). Авторы настоящего изобретения использовали стратегию встраивания пары цистеиновых мутаций в константную область TCR и обнаруживали, что они могут значительно улучшать сборку цепей и повышать экспрессию.

Эффекты межцепочечной дисульфидной связи в отношении экспрессии антител.

Для определения того, играют ли дисульфидные связи роль в поддержании структур WuXiBody, экспрессировали конструкции с дисульфидными связями в константной области TCR в химерных антителах и/или без них. Результаты электрофореза экспрессируемого WuXiBody в ПААГ в присутствии SDS показаны на фиг. 15-17. Все экспрессируемое WuXiBody являлось полностью IgG-подобной конструкцией с двумя идентичными плечами. Тестировали экспрессию конструкций с цистеиновыми мутациями и без них между S56 в С-бета и T49 в С-альфа, экспрессию конструкций с цистеиновыми мутациями между S16 или A18 в С-бета и S11 в С-пре-альфа, между Q57 в С-гамма и V50 в С-дельта и между A19 в С-гамма и E88 в С-дельта.

Результаты экспрессии конструкций с дисульфидной связью, отсутствующей в С-бета/С-альфа (SEQ ID NO: 32/42), свидетельствуют о том, что конструкции, в которых отсутствуют дисульфидные связи, не могли поддерживать структуру антитела (см. фиг. 15B). Также тестировали экспрессию конструкций с дисульфидной связью, отсутствующей в С-бета/С-пре-альфа и С-гамма/С-дельта, и получали схожие результаты. В отличие от этого, конструкции, содержащие мутантные остатки цистеина, могли образовывать межцепочечные дисульфидные связи, которые могли поддерживать Ig-подобные структуры (см. фиг. 15A).

Дизайн химерных доменов WuXibody.

Парные цистеиновые мутации (нумерация в соответствии с последовательностями на фиг. 19A-19E) в константных областях TCR встраивали в разные конструкции химерных антител с TCR, приведенных в табл. 21.

Таблица 21

Парные цистеиновые мутации для встраивания межцепочечной дисульфидной связи

Альфа-Бета	Пре-альфа-Бета		Дельта-Гамма	
	Цистеиновые парные мутации	Цистеиновые парные мутации	Цистеиновые парные мутации	Цистеиновые парные мутации
Y11-S16	<u>S11-S16</u>	<u>Дизайн 5 Пре TCR область соединения¹ Cys13</u> SEQ ID NO: <u>70/71</u>	F12-S17	Дизайн_2_Cys2_без_гликозилирования SEQ ID NO: 96/95
L13-F13	<u>S11-A18</u>	<u>Дизайн 6 Пре TCR область соединения¹ Cys14</u> SEQ ID NO: <u>72/71</u>	F12-E20	Дизайн_2_Cys3_без_гликозилирования SEQ ID NO: 99/95
L13-S16	S11-E19	Дизайн_7_Пре_TCR_область	M14-F14	Дизайн_2_Cys1_без_гликозилирования

		соединения'1_Cys15 SEQ ID NO: 73/71		SEQ ID NO: 98/97
S16-V12	A13-F13	Дизайн_3_Пре_TCR_обл асть соединения'1_Cys11 SEQ ID NO: 69/68	N16-T12	Дизайн_2_hypeCys1 _без_гликозилирова ния SEQ ID NO: 90/89
S16-E14	A13-S16	Дизайн_4_Пре_TCR_обл асть соединения'1_Cys12 SEQ ID NO: 70/68	D46-M62	Дизайн_2_hypeCys3 _без_гликозилирова ния SEQ ID NO: 94/93
V23-F13	I16-A11	Дизайн_10_Пре_TCR_об ласть соединения'1_Cys4 SEQ ID NO: 78/77	V50-Q57	Дизайн_2_hypeCys2 без_гликозилиров ания SEQ ID NO: 92/91
Y44-L62	S62-S56	Дизайн_8_Пре_TCR_обл асть соединения'1_Cys1_4L4 T_1 SEQ ID NO: 75/74	F87-A19	Дизайн_2_Cys4_без_ гликозилирования SEQ ID NOs:101/100
T46-D58	T65-S56	Дизайн_9_Пре_TCR_обл асть соединения'1_Cys2_4L4 T_2 SEQ ID NO: 75/76	E88-A19	Дизайн_2_Cys5_без гликозилирования SEQ ID NO: 101/102
T46-S76	Y59-S76	Дизайн_2_Пре_TCR_обл асть соединения'1_Cys10 SEQ ID NO: 67/66		
T49-S56				
L51-S56				
S62-S56				
S62-R78				

В случае парных цистеиновых мутаций в константных областях TCR альфа-бета дисульфидную связь T49C-S56С использовали для всех конструкций.

Для получения стабильного и функционального WuXiBody тщательно настраивали области соединения, соединяющие переменные домены антитела и константные домены TCR, их относительную ориентацию при слиянии, а также Fc-соединяющие области соединения. Т.к. структура TCR очень похожа на антитело Fab, авторы настоящего изобретения накладывали гомологичную модель антитела Fv на переменную область TCR (PDB 4L4T, фиг. 2B). Наложение структур показало, что антитело Fv структурно совместимо с константным доменом TCR. Учитывая это структурное выравнивание и соответствующие последовательности, определяли все необходимые параметры конструирования, как показано ниже.

Ориентация доменов.

Т.к. ориентация VH-C-бета/VL-C-альфа и перекрестного VH-C-альфа/VL-C-бета при слиянии может приводить к правильной сборке химерного белка, авторы настоящего изобретения конструировали и тестировали обе ориентации. Гомология последовательностей VH-VL является более близкой к TCR V-бета-V-альфа. Авторы настоящего изобретения обозначали формулы VH-C-бета/VL-C-альфа как "нормальную ориентацию", и VH-C-альфа/VL-C-бета как "перекрестную ориентацию".

Первый и второй соединительные домены.

Авторы настоящего изобретения выравнивали последовательности антитела и TCR с учетом структурного выравнивания и обнаружили, что области соединения, определенные в последовательности зародышевой линии, не всегда соответствуют тому, что отражено в структуре. Например, учитывая определение последовательностей, области соединения, соединяющие VH и CH1, должны начинаться непосредственно после последних двух остатков "SS" в области VH. Однако, структурно эти два остатка уже являются частью области соединения. Авторы настоящего изобретения определяли области соединения с учетом структуры, а не последовательности.

В табл. 1 и 2 в настоящем описании приведено основанное на структуре выравнивание последовательностей для двух исследуемых ориентации. Т.к. было затруднительным предсказать, какой домен будет совместим с каким соединительным доменом, авторы настоящего изобретения проверяли, как области соединения антитела и TCR перекрываются на наложенных структурах, и оценивали возможную за-

мену с использованием наложения друг на друга. Дизайн соединительных доменов представлен в табл. 1 и 2.

Третьи соединительные домены.

Стратегию, схожую с описанной выше использовали для выравнивания шарнирной области IgG1 и IgG4 человека с проксимальной к мембране областью TCR (т.е. шарнирной областью TCR), а также проверяли их перекрывание на структурном уровне. В табл. 7 и 8 в настоящем описании представлен дизайн третьих соединительных доменов.

Петля FG и петля DE.

Выравнивание структур константной области TCR со структурами антител показало, что петли FG и DE бета-цепи TCR являются более длинными, чем соответствующая область CH1 антитела. На фиг. 3А-3В показаны различия константных областей между бета-цепью Т-клеточного рецептора и тяжелой цепью антитела. Для тестирования того, как эти две петли могут нарушать структуру, если CH1 заменяют бета-цепью TCR, получали конструкции с этими двумя петлями и без них.

Учитывая изложенное выше, всего получали девять конструкций, комбинируя эти параметры, как показано в табл. 22 и 23.

Таблица 22

Дизайн химерных белков WuXiBody (С-бета/С-альфа)

SEQ ID NO (Тяжелая цепь (HC)/Легкая цепь (LC))-IgG1	Ориентация	Область соединения	Область соединения'	Петля FG	Петля DE
Дизайн_1 SEQ ID NO: 2/1	Нормальная	Область соединения_ 1	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Дизайн_2 SEQ ID NO: 4/3	Нормальная	Область соединения_ 2	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Дизайн_3 SEQ ID NO: 9/8	Перекрестная	Область соединения_ 3	Область соединения'_2 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Дизайн_4 SEQ ID NO: 10/8	Перекрестная	Область соединения_ 4	Область соединения'_2 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Дизайн_5 SEQ ID NO: 5/1	Нормальная	Область соединения_ 1	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Замененная	Нативная
Дизайн_6 SEQ ID NO: 6/3	Нормальная	Область соединения_ 2	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Замененная	Нативная
Дизайн_6а SEQ ID NO: 7/3	Нормальный	Область соединения_ 2	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Замененная	Замененная
Дизайн_7 SEQ ID NO: 9/11	Перекрестная	Область соединения_ 3	Область соединения'_2 (IgG1, IgG4)	Замененная	Нативная
Дизайн_8 SEQ ID NO: 10/11	Перекрестная	Область соединения_ 4	Область соединения'_2 (IgG1, IgG4)	Замененная	Нативная

Компоненты и последовательности химерных белков WuXiBody (С-бета/С-альфа)

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к С-концу и их SEQ ID NO				
	Вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH или VL)	Первый или второй соединительный домен (CJ)	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный домен+шарнирная область (CJ')	Домен димеризации (D)
HC Дизайн_1	VH(CD3)	HCJ1	С-бета (S56C)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_1	VL(CD3)	LCJ1	С-альфа (T49C)		
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 43		
HC Дизайн_2	VH(CD3)	HCJ2	С-бета (S56C)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2	VL(CD3)	LCJ2	С-альфа (T49C)		
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 43		
HC Дизайн_3	VH(CD3)	HCJ3	С-альфа (T49C)	CJ'2G1	FcG1
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_3	VL(CD3)	LCJ3	С-бета (S56C)		

SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 33+NO: 306		
HC Дизайн_4	VH(CD3)	HCJ4	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FcG1
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_4	VL(CD3)	LCJ3	С-бета (S56С)		
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 33+NO: 306		
HC Дизайн_5	VH(CD3)	HCJ1	С-бета (S56С) (FG-)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_5	VL(CD3)	LCJ1	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 43		
HC Дизайн_6	VH(CD3)	HCJ1	С-бета (S56С)(FG -)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_6	VL(CD3)	LCJ2	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 43		
HC Дизайн_6а	VH(CD3)	HCJ2	С-бета (S56С)(DE	CJ'1G1	FcG1

			-FG-)		
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_6а	VL(CD3)	LCJ2	С-альфа (Т49С)		
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 43		
HC Дизайн_7	VH(CD3)	HCJ3	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FcG1
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 129	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_7	VL(CD3)	LCJ3	С-бета (S56С)(FG -)		
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 37+NO: 306		
HC Дизайн_8	VH(CD3)	HCJ4	С-альфа (Т49С)	CJ'2G1	FcG1
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 130	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_8	VL(CD3)	LCJ3	С-бета (S56С)(FG -)		
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 308	SEQ ID NO: 37+NO: 306		

Пример 2. Получение и характеристика моноспецифических химерных белков TCR/антитела.

Перед слиянием константных доменов TCR в конструкции биспецифического антитела, сначала оценивали осуществимость их встраивания в обычный моноспецифический IgG. Для осуществления этого исследования для подтверждения концепции выбирали разработанное для собственного использования антитело против CD3, названное Т3. Константные домены CH1 и CL Т3 IgG заменяли соответствующей константной областью TCR (С-альфа и С-бета). Использовали все девять разных стратегий, приведенных в табл. 22 (см. выше) и все конструкции экспрессировали в системе Expi293.

В табл. 24 приведен уровень экспрессии сконструированных белков в собранных супернатантах, количественно анализируемый посредством Q-ELISA. В основном, большинство из конструкций с "нормальной ориентацией" имело лучшую экспрессию, чем форматы с "перекрестной ориентацией", и большинство из "соединительных областей TCR" были лучше "соединительных областей антитела". Две конструкции с "нормальной ориентацией", Дизайн_5 и Дизайн_6, имели экспрессию, сравнимую с экспрессией Дизайн_2. В случае двух конструкций с "перекрестной ориентацией", Дизайн_7, 8 имели лучшую экспрессию, чем Дизайн_3, 4. Наблюдали низкую экспрессию экстрадлинной петли FG в С-бета TCR, что позволяет предполагать, что эта петля FG может вызывать значительные стерические столкновения со слитым доменом VL антитела.

Таблица 24

Уровни экспрессии и связывание с CD3 всех конструкций в супернатанте

Образцы (IgG1)	Уровень экспрессии в супернатанте (мкг/мл)	Концентрация (нМ) при FACS		
		5,0	0,4	0,032
		MFI		
Т3	N/A	5101	2937	408
Дизайн_1	72,04	5441	2190	292
Дизайн_2	204,42	5833	2616	380
Дизайн_3	15,35	5089	982	137
Дизайн_4	26,11	5438	1213	168
Дизайн_5	113,68	5388	1865	249
Дизайн_6	178,56	5789	3914	613
Дизайн_6а	173,60	5794	2822	405
Дизайн_7	75,69	6322	1929	259
Дизайн_8	98,63	6412	1831	243

Эти результаты полностью отличаются от описанного Wu et al. в отношении их дизайна схожих химерных белков антитело-TCR (Wu et al. 2015, выше): их конструкции с "перекрестной ориентацией" имели низкую экспрессию. Их конструкции с "нормальной ориентацией" даже не экспрессировались.

Для подтверждения того, подвергаются ли экспрессируемые белки правильному фолдингу и сохраняют ли исходную функцию, авторы настоящего изобретения тестировали их связывание с CD3-положительными клетками Jurkat. Для анализа связывания всех образцов посредством FACS использовали три разные концентрации: 5,0, 0,4 и 0,032 нм. В качестве положительного контроля использовали исходное антитело Т3 дикого типа. Данные о дозозависимом связывании CD3 приведены в колонках 3-5 табл. 24. Дизайн_2, Дизайн_6 и Дизайн_6а демонстрировали лучшую связывающую способность, сравнимую с нативным антителом Т3. Примечательно, что все эти три конструкции оказались лучшими тремя экспрессируемыми форматами в клетках млекопитающего. Эта сильная корреляция позволяет предполагать, что уровень экспрессии или связывания может являться результатом одного молекулярного происхождения, т.е. совместимости варибельного домена антитела и константных доменов TCR, для которых необходимо тщательное конструирование компонентов, таких как соединительные домены и межцепочечная дисульфидная связь и т.д.

Учитывая уровень экспрессии и активность связывания, в качестве конечного формата для дальнейшей разработки выбирали Дизайн_2.

Пример 3. Дегликозилирование.

Посттрансляционные модификации (PTM), подобные участкам N-гликозилирования, в антителе могут вызывать гетерогенность белков, что затрудняет разработку. Таким образом, предпринимали попытку удалить участки N-гликозилирования в константной области TCR. В константной области TCR обнаружено всего четыре участка N-гликозилирования. Один из них находится в С-бета (N69, см. SEQ ID NO: 244), и а другие три - в С-альфа (N34, N68 и N79, см. SEQ ID NO: 241). Данные об экспрессии, представленные в настоящем описании, позволяют предполагать, что эти участки, особенно участки в С-альфа, фактически, сильно гликозилированы, когда молекулу экспрессируют в клетке млекопитающего.

Все участки гликозилирования в Дизайн_2 удаляли посредством замены четырех остатков Asn на Gln или Ala (обозначены как Дизайн_2-QQQQ или -AAAA, см. табл. 25). Хотя эта стратегия распространена в белковой инженерии, показано, что мутации Gln/Ala могут влиять на уровень экспрессии химерных белков TCR/антитело (Wu et al., 2015, выше). Для снижения риска этого также использовали остатки из пре-TCR (N68S в С-альфа) и TCR макаки (N79 в С-альфа, N69E в С-бета) в соответствующих положениях (обозначены как Дизайн_2-QSKE и -ASKE) (см. табл. 25). Кроме того, показано, что в С-альфа может существовать атипичный участок гликозилирования (N61) (Wollscheid et al., Nature Biotechnology, 27(4), pp. 378-386 (2009) "Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins." Wollscheid B., Bausch-Fluck D., Henderson C., O'Brien R., Bibel M., Schiess R., Aebersold R., Watts J.D., Nat. Biotechnol. 27:378-386(2009) [PubMed] [Europe PMC]). Таким образом, этот остаток также подвергают мутации в Gln (обозначен как Дизайн_2-QQQQQ, см. табл. 25). Всех мутантов экспрессировали в Expi293 для дальнейшего тестирования.

Таблица 25

Уровни экспрессии всех дегликозилированных конструкций в супернатанте

Образец	Уровень экспрессии в супернатанте (мкг/мл)	SEQ ID NO (HC-C-бета/LC-C-альфа)
Дизайн_2-QQQQ	334,39	13/12 (IgG1) 21/12 (IgG4)
Дизайн_2-AAAA	414,58	15/14 (IgG1)
Дизайн_2-QSKE	311,48	17/16 (IgG1)
Дизайн_2-ASKE	107,89	17/18 (IgG1)
Дизайн_2-QQQQQ	213,31	20/19 (IgG1)

Таблица 26

Компоненты дегликозилированных конструкций

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к C-концу и их SEQ ID NO				
	Вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH или VL)	Первый или второй соединительный домен (CJ)	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный домен+шарнирная область (CJ')	Домен димеризации (D)
HC Дизайн_2-QQQQ (IgG1)	VH(CD3)	HCJ2	C-бета (S56C) (N69Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2-QQQQ (IgG1)	VL(CD3)	LCJ2	C-альфа (T49C) (N34Q+N68Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 44		
HC Дизайн_2-QQQQ (IgG4)	VH(CD3)	HCJ2	C-бета (S56C) (N69Q)	CJ'1G4	FcG4
SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 303
LC	VL(CD3)	LCJ2	C-альфа		

Дизайн_2- QQQQ (IgG4)			(T49C) (N34Q+N68 Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 44		
HC Дизайн_2- AAAA (IgG1)	VH(CD3)	HCJ2	C-бета (S56C) (N69A)	CJ*1G1	FcG1
SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- AAAA (IgG1)	VL(CD3)	LCJ2	C-альфа (T49C) (N34A+N68 A+N79A)		
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 45		
HC Дизайн_2- QSKE (IgG1)	VH(CD3)	HCJ2	C-бета (S56C) (N69E)	CJ*1G1	FcG1
SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- QSKE (IgG1)	VL(CD3)	LCJ2	C-альфа (T49C) (N34Q+N68 S+N79K)		
SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 46		
HC Дизайн_2- ASKE (IgG1)	VH(CD3)	HCJ2	C-бета (S56C) (N69E)	CJ*1G1	FcG1
SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- ASKE (IgG1)	VL(CD3)	LCJ2	C-альфа (T49C) (N34A+N68 S+N79K)		
SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 47		
HC Дизайн_2- QQQQ (IgG1)	VH(CD3)	HCJ2	C-бета (S56C) (N69Q)	CJ*1G1	FcG1
SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2- QQQQ (IgG1)	VL(CD3)	LCJ2	C-альфа (T49C) (N34Q+N68 Q+N79Q+N 61Q)		
SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 48		

Уровни экспрессии в супернатантах оценивали посредством Q-ELISA, как показано в табл. 25. Примечательно, что только одна из дегликозилированных конструкций имела немного сниженный уро-

вень экспрессии. Простые мутации в Gln или Ala не имели каких-либо отрицательных эффектов, как показал электрофорез в невосстановительных условиях (фиг. 4), и определяли полосу 150 кДа. В геле для электрофореза в восстановительных условиях (фиг. 4) определяли полосу 25 кДа. И то, и другое свидетельствует об успешном устранении гликозилирования легкой цепи и тяжелой цепи. Мутеины с удаленными N-гликанами в константной области TCR тестировали на связывание с CD3. На фиг. 5 показано связывание разных мутеинов на CD3⁺ клетках Jurkat. Кривые мутеинов лишь немного сдвинуты вправо по сравнению с кривыми антитела T3 дикого типа, что может являться результатом того, что детекторное антитело является более чувствительным к IgG человека, чем к химерному белку. Максимальное связывание не изменилось. В целом, большинство дегликозилированных конструкций не проявляли каких-либо очевидных различий в экспрессии или связывании. В качестве конструкции для дальнейшего исследования выбирали Дизайн_2-QQQQ.

В схожем исследовании, проведенном Wu et al. (Wu et al. 2015, выше), получали мутации дегликозилирования в формате с "перекрестной ориентацией", т.к. их форматы с "нормальной ориентацией" не экспрессировались.

Пример 4. Дизайн WuXiBody на основе TCR пре-альфа/бета.

Антигенный рецептор пре-Т-клеток (пре-TCR), экспрессируемый незрелыми тимоцитами, играет ключевую роль в раннем развитии Т-клеток. Пре-TCR имеет обычную бета-цепь, но особую пре-альфа-цепь только с константной областью, ее последовательность и структура в достаточной степени отличаются от альфа-цепи. Т.к. константная область обычного TCR совместима с переменной областью антитела, ожидали, что пре-TCR (см. PDB 3OF6, SEQ ID NO: 246) также можно использовать в дизайне химерного белка. Конструкции антител приведены в табл. 27.

Таблица 27

Дизайн химерных белков для WuXiBody на основе TCR пре-альфа/бета

	Ориентация	Область соединения	Область соединения'	Петля FG	Петля DE
Пре-TCR_Дизайн_A	Нормальная	Область соединения_A	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Пре-TCR_Дизайн_B	Нормальная	Область соединения_B	Область соединения'_1 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Пре-TCR_Дизайн_C	Перекрестная	Область соединения_C	Область соединения'_2 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
Пре-TCR_Дизайн_D	Перекрестная	Область соединения_D	Область соединения'_2 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная

Комбинируя эти параметры получали всего десять химерных конструкций, как указано в табл. 28.

Таблица 28

Соответствие дизайна химерного белка пре-TCR-антителу в форме IgG1

Конструкции в таблице 27	Последовательность	SEQ ID NO (HC/LC)
Пре-TCR_Дизайн_B	Дизайн_1_Пре_TCR_область соединения'_1	65/64
	Дизайн_2_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys10	67/66
	Дизайн_3_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys11	69/68
	Дизайн_4_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys12	70/68
	Дизайн_5_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys13	70/71
	Дизайн_6_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys14	72/71
	Дизайн_7_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys15	73/71
	Дизайн_8_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys1_4L4T_1	75/74
	Дизайн_9_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys2_4L4T_2	75/76
	Дизайн_10_Пре_TCR_область соединения'_1_Cys4	78/77
Пре-TCR_Дизайн_C	Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_1	137/136
	Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_1	137/139
Пре-TCR_Дизайн_D	Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_2	138/136
	Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_2	138/139

Таблица 29

Компоненты конструкции химерного белка пре-TCR-антитело в форме IgG1

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к C-концу и их SEQ ID NO				
	Вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH или VL)	Первый или второй соединительный домен (CJ)	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный домен+шарнирная область (CJ')	Домен димеризации (D)
HC Дизайн_1_Пре_TC R_область соединения'1	VH(CD3)	HCJB	C-бета (N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_1_Пре_TC R_область соединения'1	VL(CD3)	LCJB	C-пре-альфа (N50Q)		
SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 83		
HC Дизайн_2_Пре_TC R_область соединения'1_Cy s10	VH(CD3)	HCJB	C-бета (S76C)(N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 319	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_2_Пре_TC R_область соединения'1_Cy s10	VL(CD3)	LCJB	C-пре-альфа (Y59C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 311		
HC Дизайн_3_Пре_TC R_область соединения'1_Cy s11	VH(CD3)	HCJB	C-бета (F13C)(N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 320	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_3_Пре_TC R_область соединения'1_Cy s11	VL(CD3)	LCJB	C-пре-альфа (A13C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 312		
HC Дизайн_4_Пре_TC R_область соединения'1_Cy s12	VH(CD3)	HCJB	C-бета (S16C)(N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 320	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302

	NO: 300	50	321	NO: 53	NO: 302
LC Дизайн_4_Пре_ТC R_область соединения'_1_Су s12	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (A13C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 312		
HC Дизайн_5_Пре_ТC R_область соединения'_1_Су s13	VH(CD3)	HCJB	С-бета (S16C)(N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 321	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_5_Пре_ТC R_область соединения'_1_Су s13	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 313		
HC Дизайн_6_Пре_ТC R_область соединения'_1_Су s14	VH(CD3)	HCJB	С-бета (A18C)(N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 322	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_6_Пре_ТC R_область соединения'_1_Су s14	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)		

SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 313		
HC Дизайн_7_Пре_ТС R_область соединения'_1_Су s15	VH(CD3)	HCJB	С-бета (E19C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 323	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_7_Пре_ТС R_область соединения'_1_Су s15	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 313		
HC Дизайн_8_Пре_ТС R_область соединения'_1_Су s1_4L4T_1	VH(CD3)	HCJB	С-бета (S56C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_8_Пре_ТС R_область соединения'_1_Су s1_4L4T_1	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (S62C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 314		
HC Дизайн_9_Пре_ТС R_область соединения'_1_Су	VH(CD3)	HCJB	С-бета (S56C)(N69Q)	CJ'1G1	FcG1

s2_4L4T_2					
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_9_Пре_ТC R_область соединения'_1_Су s2_4L4T_2	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (Т65С)(N50Q)		
SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 315		
HC Дизайн_10_Пре_Т CR_область соединения'_1_Су s4	VH(CD3)	HCJB	С-бета (A11C)(N69Q)	CJ'1G1	FeG1
SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 324	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 302
LC Дизайн_10_Пре_Т CR_область соединения'_1_Су s4	VL(CD3)	LCJB	С-пре-альфа (I16C)(N50Q)		
SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 309	SEQ ID NO: 316		
HC Пре- TCR_Дизайн_5_пе рекрестный_1	VH(CD3)	HCJC	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)	CJ'2G1	FeG1
SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Пре- TCR_Дизайн_5_пе рекрестный_1	VL(CD3)	LCJC	С-бета (N69Q, S16C)		
SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 321+ 306		

HC Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_1	VH(CD3)	HCJC	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)	CJ'2G4	FcG4
SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 132	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 303
LC Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_1	VL(CD3)	LCJC	С-бета (N69Q, A18C)		
SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 322+ 306		
HC Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_2	VH(CD3)	HCJD	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)	CJ'2G1	FcG1
SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Пре-TCR_Дизайн_5_перекрестный_2	VL(CD3)	LCJC	С-бета (N69Q, S16C)		
SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: NO:321+ 306		
HC Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_2	VH(CD3)	HCJD	С-пре-альфа (S11C)(N50Q)	CJ'2G1	FcG1
SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 133	SEQ ID NO: 313	SEQ ID NO: 134	SEQ ID NO: 302
LC Пре-TCR_Дизайн_6_перекрестный_2	VL(CD3)	LCJC	С-бета (N69Q, A18C)		
SEQ ID NO: 139	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 322+306		

Описанное в примерах 1-3 позволяет предполагать, что "нормальная ориентация" и соединительный домен, который в большей степени принадлежит остаткам TCR, больше подходит для получения подходящих химерных белков. Таким образом, использовали ту же стратегию и конструировали соединительные домены легкой цепи и тяжелой цепи, как показано в табл. 3 и 4. В отличие от обычной альфа-цепи, в этом случае есть только один участок гликозилирования (N50) в пре-альфа-цепи TCR, подвергнутый мутации в остаток Gln (см. SEQ ID NO: 247). Вся тяжелая цепь с константной областью бета-цепи была той же, что и в Дизайн_2 в табл. 22, при этом участок N-гликозилирования (N69) заменяли остатком Gln (см. SEQ ID NO: 244).

Третьи соединительные домены в нормальной ориентации конструировали идентичными доменам, приведенным в табл. 7, и третьи соединительные домены в перекрестной ориентации конструировали идентичными доменам, приведенным в табл. 8 (химерные антитела на основе TCR альфа/бета).

Пре-TCR не содержит нативную межцепочечную дисульфидную связь выше третьего соединительного домена. Аналогично конструированию, которому подвергали обычный TCR, авторы настоящего изобретения встраивали дисульфидную связь в область контакта бета-цепи и пре-альфа-цепи в константной области для улучшения стабильности химерного белка (см. табл. 11). Исследовали все остатки в области контакта в кристаллической структуре пре-TCR (PDB 3OF6) и получали список межцепочечных пар, в которых атомы углерода С-альфа и С-бета находились на расстоянии в пределах 7 Å и 5 Å, соответственно (см. табл. 11). Затем каждую идентифицированную пару заменяли остатками Cys и экспрессировали мутеин в клетках Expi293.

Пример 5. Дизайн химерных антител на основе TCR гамма/дельта.

TCR, состоящие из гамма- и дельта-цепи, являются менее распространенными, но гетеродимерная природа белка также может быть полезной в дизайне нового химерного формата. Следуя стратегии и способам, валидированным в примере 1, авторы настоящего изобретения получали новые химерные конструкции, в которых использовали константную область TCR дельта-гамма для замены соответствующей области антитела. Структуру TCR дельта-гамма (PDB 4LFH, см. SEQ ID NO: 249 и 252) использовали для облегчения основанного на структуре выравнивания последовательностей антитела и TCR.

В табл. 5 и 6 приведены сконструированные соединительные домены для "нормальной ориентации" и "перекрестной ориентации", соответственно. В табл. 9 и 10 приведены соответствующие соединитель-

ные домены IgG1 и IgG4 разных ориентации. Структура TCR дельта-гамма больше похожа на антитело, чем TCR альфа-бета. Не осуществляли дизайн дополнительных петель FG и DE. Все участки N-гликозилирования (N65 в гамма-цепи и N16 и N79 в дельта-цепи, см. SEQ ID NO: 250) удаляли посредством замены Gln (Q). Дисульфидную связь в области контакта конструировали посредством той же стратегии, что и в примере 4.

Таблица 30

Дизайн химерного белка TCR/антитело

	Ориентация	Первый и второй соединительный домен	Третий соединительный домен	Петля FG	Петля DE
dg_Дизайн_1	Нормальная	Область соединения_4	область соединения'_3 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
dg_Дизайн_2	Нормальная	Область соединения_5	область соединения'_3 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
dg_Дизайн_3	Перекрестная	Область соединения_6	область соединения'_4 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная
dg_Дизайн_4	Перекрестная	Область соединения_7	область соединения'_4 (IgG1, IgG4)	Нативная	Нативная

Комбинируя эти параметры, получали всего тринадцать химерных конструкций, как указано в табл. 31.

Таблица 31

Соответствие дизайна химерного TCR/антитело в случае С-гамма/С-дельта

Конструкции IgG1 в таблице 30	Конструкции	SEQ ID NO в HC/LC
dg_Дизайн_1	dg_Дизайн_1	108/107
dg_Дизайн_2	dg_Дизайн_2	106/105
	dg_Дизайн_2_без_гликозилирования	86/85
	dg_Дизайн_2_hyrcys1_без_гликозилирования	90/89
	dg_Дизайн_2_hyrcys2_без_гликозилирования	92/91
	dg_Дизайн_2_hyrcys3_без_гликозилирования	94/93
	dg_Дизайн_2_cys2_без_гликозилирования	96/95
	dg_Дизайн_2_cys1_без_гликозилирования	98/97
	dg_Дизайн_2_cys3_без_гликозилирования	99/95
	dg_Дизайн_2_cys4_без_гликозилирования	101/100
	dg_Дизайн_2_cys5_без_гликозилирования	101/102
dg_Дизайн_3	dg_перекрестный_Дизайн_1	110/109
dg_Дизайн_4	dg_перекрестный_Дизайн_2	112/111

Компоненты конструкции химерного белка TCR/антитело в случае С-гамма/С-дельта

Название комплекса и SEQ ID NO цепи	Домены с N-конца к С-концу и их SEQ ID NO				
	Вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH или VL)	Первый или второй соединительный домен (CJ)	Константный домен TCR (C1 или C2)	Третий соединительный домен+шарнирная область (CJ')	Домен димеризации (D)
HC dg_Дизайн_1	VH(CD3)	HCJ4	С-гамма	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 108	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 117	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_1	VL(CD3)	LCJ4	С-дельта		
SEQ ID NO: 107	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 310		
HC dg_Дизайн_2	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта		
SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 115		
HC dg_Дизайн_2 _без_гликоз илирования	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (N65Q)	CJ'3G1	FeG1
SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта		

dg_Дизайн_2_без_гликозилирования			(N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 116		
НС dg_Дизайн_2_хуреСус1_без_гликозилирования	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (T12C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_хуреСус1_без_гликозилирования	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (N16C) (N79Q)		
SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 325		
НС dg_Дизайн_2_хуреСус2_без_гликозилирования	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (Q57C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 334	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2_хуреСус2_без_гликозилирования	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (V50C) (N16Q+N79Q))		
SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 326		
НС	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма	CJ'3G1	FcG1

dg_Дизайн_2 _hуpeCys3_б ез_гликозил ирования			(M62C) (N65Q)		
SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2 _hуpeCys3_б ез_гликозил ирования	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (D46C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 327		
HC dg_Дизайн_2 _Cys2_без_г ликозилиров ания	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (S17C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 336	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2 _Cys2_без_г ликозилиров ания	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (F12C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 328		
HC dg_Дизайн_2 _Cys1_без_г ликозилиров ания	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (F14C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302

LC dg_Дизайн_2 _Cys1_без_г ликозилиров ания	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (M14C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 329		
HC dg_Дизайн_2 _Cys3_без_г ликозилиров ания	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (E20C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 338	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2 _Cys3_без_г ликозилиров ания	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (F12C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 328		
HC dg_Дизайн_2 _Cys4_без_г ликозилиров ания	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (A19C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2 _Cys4_без_г ликозилиров ания	VL(CD3)	LCJ5	С-дельта (F87C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO:	SEQ ID	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:		

100	NO: 301	120	330		
HC dg_Дизайн_2 _Cys5_без_г ликозилиров ания	VH(CD3)	HCJ5	С-гамма (A19C) (N65Q)	CJ'3G1	FcG1
SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 118	SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 121	SEQ ID NO: 302
LC dg_Дизайн_2 _Cys5_без_г ликозилиров ания		LCJ5	С-дельта (E88C) (N16Q+N79Q)		
SEQ ID NO: 102		SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 331		
HC dg_перекрес тный_Дизай н_1	VH(CD3)	HCJ6	С-дельта	CJ'4G1	FcG1
SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 302
LC dg_перекрес тный_Дизай н_1	VL(CD3)	LCJ6	С-гамма		
SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 340		
HC dg_перекрес тный_Дизай н_2	VH(CD3)	HCJ7	С-дельта	CJ'4G1	FcG1
SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 300	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 302
LC dg_перекрес тный_Дизай н_2	VL(CD3)	LCJ7	С-гамма		
SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 301	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 340		

Пример 6. Тестирование неправильного спаривания тяжелых и легких цепей антитела.

Одной из проблем при получении биспецифического антитела в IgG-подобном формате является неконтролируемое неправильное спаривание легких и тяжелых цепей. Авторы настоящего изобретения оценивали то, могут ли замененный TCR бета и альфа домен CH1 и CL собираться с нормальной тяжелой цепью и легкой цепью IgG, когда они коэкспрессируются в одной клетке-хозяине.

Помимо антитела против CD3 T3, авторы настоящего изобретения также разрабатывали моноклональное антитело U4 против В-лимфоцитарного антигена CD19. Для проверки того, насколько вероятно то, что легкие цепи и тяжелые цепи двух нативных антител будут неправильно спариваться, пары легких и тяжелых цепей T3 и U4 специально меняли местами (T3_легкая-U4_тяжелая, T3_тяжелая-U4_легкая) и коэкспрессировали в клетках Expi293. Для наглядного сравнения осуществляли такое же исследование с использованием TCR-модифицированного T3. На фиг. 6A-6B показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS для белков в IgG1 и IgG4. В случае переставленных пар с использованием нативных антител при наличии полосы 150 кДа в ПААГ в невозстановительных условиях и полосы 50 кДа и 23 кДа в ПААГ в восстановительных условиях четко подтверждали сборку неправильно спаренного белка IgG. Однако после встраивания TCR-модифицированного T3 полосы 150 кДа в геле больше не обнаруживали, что свидетельствует о том, что ни одна из некогатных пар не могла собраться в антитело-подобную молекулу. Эти данные подтверждают, что сконструированный авторами настоящего изобретения TCR-модифицированный Fab может эффективно предотвращать неправильное спаривание некогатных цепей.

Пример 7. Получение и характеристика химерных белков Fab-TCR.

Чтобы убедиться, что TCR-модифицированное антитело Fab можно использовать для конструирования биспецифического антитела, конструировали Fab-фрагменты, укороченные в двух положениях. На фиг. 8 показано, что Fab TCR-модифицированного T3 с удаленным N-гликаном успешно экспрессировали и очищали (T3-Fab-Дизайн_2.his1 (SEQ ID NO: 30/12) и T3-Fab-Дизайн_2.his2 (SEQ ID NO: 31/12)). Их способность к связыванию с CD3 также оценивали с помощью CD3⁺ клеток Jurkat и сравнивали с моновалентной формой T3 дикого типа. На фиг. 9 показано, что химерный Fab и моновалентное T3 имели качественно схожие связывающие свойства. Отклонения могут являться результатом различий способов детекции белков с метками His и Fc.

Пример 8. Получение и характеристика биспецифического антитела на основе TCR с "выступами-во-впадины".

После успешного слияния константного домена TCR с моноспецифическим антителом T3 и подтверждения того, что с помощью нового формата можно эффективно предотвращать неправильное спаривание цепей с антителом U4, авторы настоящего изобретения конструировали биспецифические форматы.

TCR-модифицированное T3 и U4 дикого типа с мутациями "выступы-во-впадины", используемыми в домене CH3 Fc, коэкспрессировали в клетках Expi293. Получали мутации "выступы-во-впадины" S139C и T151W в домене CH3 (SEQ ID NO: 295, "выступ") T3 и Y134C, T151S, L153A и Y192V в домене CH3 (SEQ ID NO: 296, "впадина") U4 изотипа IgG1. Альтернативно, получали мутации "выступы-во-впадины" S136C и T148W в домене CH3 (SEQ ID NO: 298, "выступ") T3 и Y131C, T148S, L150A и Y189V в домене CH3 (SEQ ID NO: 299, "впадина") U4 изотипа IgG4. На фиг. 7A-7B показаны результаты электрофореза в ПААГ в присутствии SDS полученных белков в форме IgG1 и IgG4 после очистки. Выход после первой стадии очистки с протеином А достигал 125 мг/л и 173,7 мг/л для IgG1 и IgG4, соответственно. Четко наблюдали правильную молекулярную массу, т.е. полосы приблизительно 150 кДа в геле в невозстановительных условиях, а также полосы приблизительно 50 и 25 кДа в геле в восстановительных условиях. Очищенные образцы дополнительно исследовали с помощью SEC-ВЭЖХ. Чистота IgG1 и IgG4 достигала 98,63% и 100%. Данные свидетельствуют о том, что IgG-подобные молекулы в форме IgG1 и IgG4 хорошо экспрессировались и собирались. Эти включающие TCR, новые биспецифические форматы обозначали как "E17-Дизайн_2-QQQQ"(SEQ ID NO: 22/12/24/23 для IgG1 и SEQ ID NO: 25/12/26/23 для IgG4).

Хотя в случае сконструированного биспецифического антитела наблюдали ожидаемую молекулярную массу, было необходимым определить, сохраняет ли каждое плечо свою исходную способность к связыванию с их индивидуальным когнатным антигеном. Т.к. для каждой мишени E17-Дизайн_2 являлось моновалентным связывающим средством, авторы настоящего изобретения также конструировали моновалентную версию нативного T3 и нативного U4 для наглядного сравнения. На фиг. 10A и фиг. 10B показаны результаты связывания при FACS сконструированного биспецифического антитела с CD3⁺ клетками Jurkat и CD19⁺ клетками Ramos, соответственно. Плечо TCR-модифицированного T3 проявляло умеренную потерю связывания по сравнению с T3 дикого типа, но IgG4 превосходило IgG1 и было близким к нативному белку. Связывание плеча U4 не снижалось под действием соседнего сконструированного плеча T3. Оно имело связывание, схожее с исходным антителом U4 в моновалентной форме. Примечательно, в этот раз IgG1 превосходило IgG4. Неясно, почему изотип играет роль в поддержании моновалентного связывания. В наблюдаемое явление могут носить свой вклад факторы, подобные стабильности константной области TCR, выбора дизайнера третьего соединительного домена или взаимодействиям между двумя плечами Fab.

Моновалентное связывание TCR-модифицированного биспецифического формата с CD3 и CD19 снижалось по сравнению с бивалентными родительскими антителами. Известно, что активация Т-клеток посредством связывания с CD3 является достаточно чувствительной. Сильная стимуляция Т-клеток может иметь побочные эффекты. Таким образом, относительно слабое связывание с CD3, вероятно, являлось приемлемым и даже желательным по причинам, связанным с безопасностью. Однако слабое связывание с CD19 может напрямую влиять на его способность к направляемому биспецифическим антителом цитолизу В-клеток и, таким образом, снижает эффективность лекарственного средства. Для подтверждения важности связывания с CD19 и для тестирования универсальности химерных конструкций, полученных авторами настоящего изобретения, они получали другие биспецифические конструкции, названные "F16-Дизайн_2-QQQQ" в IgG4, в которых сконструированное плечо T3 все равно будет моновалентным, но плечо U4 будет бивалентным.

Новую конструкцию экспрессировали, очищали и подвергали эксперименту по связыванию. На фиг. 11A-11B показаны результаты анализа связывания FACS по сравнению со сконструированным ранее E17 и двумя родительскими антителами T3 и U4. Примечательно, что F16-Дизайн_2-QQQQ имело улучшенное связывание с CD3 и CD19 (SEQ ID NO: 25/12/27/23 в порядке HC/LC (антитело против CD3)/HC/LC (антитело против CD19)). Его связывание с CD19 (SEQ ID NO: 27/23) было сравнимым со связыванием антитела U4 дикого типа. Данные подтверждали, что дизайн химерной конструкции с T3, полученной авторами настоящего изобретения, можно использовать в отношении разных биспецифических форматов.

Пример 9. Анализ *in vitro* направляемого биспецифическим антителом цитолиза опухолевых клеток.

Функциональный анализ *in vitro* осуществляли для проверки активности сконструированного биспецифического формата в Т-клеточном цитолизе злокачественных В-клеток. Сначала тестировали конструкцию E17. В качестве отрицательных контролей использовали родительские моноспецифические антитела T3 и U4. На фиг. 12 показана дозозависимая цитолитическая функция этого биспецифического формата E17. E17-IgG4 ($EC_{50}=57$ пМ) было более активным, чем E17-IgG1 ($EC_{50}=624$ пМ). Для улучшения активности цитолиза формат F16, имеющий два участка связывания CD19, также сравнивали с E17. Как показано на фигуре 13, по сравнению с E17 ($EC_{50}=17,7$ пМ) активность F16 ($EC_{50}=5,5$ пМ) была в 3 раза выше. Данные подтверждали эффект влияния связывания с CD19 в отношении цитолиза. В качестве отрицательного контроля использовали неродственное антитело IgG4 человека.

Пример 10. Характеризация посредством масс-спектрометрии.

Для подтверждения того, что полученное биспецифическое антитело собирается правильно, авторы настоящего изобретения охарактеризовывали молекулу E17-Дизайн_2-QQQQ посредством масс-спектрометрии. Различия теоретической молекулярной массы между двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями составляли приблизительно 4000 Да и 500 Да, соответственно. На фиг. 14А показаны спектры белка в невозстановительных условиях. Пик 148180 Да соответствовал ожидаемой массе молекулы правильно собранного биспецифического антитела. Отсутствие других пиков свидетельствует о том, что мутации "выступы-во-впадины" в Fc-области, а также замененные TCR области CH1/CL правильно функционировали при спаривании четырех желаемых цепей. Примечательно, что с помощью массовых спектров в невозстановительных условиях нельзя отличить правильно собранное биспецифическое антитело от IgG, в котором обе легкие цепи неправильно спарены. Однако в примере 4 указано, что неправильно спаренные тяжелые и легкие цепи не будут экспрессироваться или собираться, что устраняет возможность неправильного спаривания обеих пар тяжелых и легких цепей.

В невозстановительных условиях (см. фиг. 14А) наблюдали пик 149128 Да, приблизительно на 947 Да превышающий вычисленную массу молекулы. Масс-спектрометрический анализ также осуществляли с использованием белка в восстановительных условиях. На фиг. 14В показано, что фактически пик был на расстоянии 948 Да от химерной легкой цепи VL-C-альфа, что свидетельствует о O-гликановых модификациях (GlcNAc+Hex+2·NeuAc) в легкой цепи.

Пример 11. Тестирование термостабильности.

Авторы настоящего изобретения дополнительно тестировали и сравнивали термостабильность сконструированных биспецифических антител в форме IgG1 и IgG4 посредством измерения температуры плавления белка T_m с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF). В качестве контролей использовали нативное моноспецифическое T3 и TCR-модифицированное T3 (Дизайн_2 и Дизайн_2-QQQQ).

В табл. 33 приведены измеренные значения T_{on} , T_m новых конструкций. В целом, все молекулы демонстрировали приемлемую термостабильность. IgG1-подобные молекулы были более стабильными, чем IgG4-подобные молекулы. Значение T_m нативного антитела T3 составляло 74°C. Химерные белки TCR-антитело имели относительно более низкую T_m приблизительно 60°C, что позволяет предполагать, что С-бета-С-альфа TCR может быть менее устойчивым к повышенным температурам по сравнению с CH1-CL нормального антитела. Это соответствует описанному Wu (Wu et al. 2015, выше), и предполагали, что домен С-альфа был менее стабильным, чем С-бета (Toughiri et al. mAbs, 862(July), pp. 1276-1285(2016)).

Мутации, приводящие к устранению N-гликозилирования в константной области TCR, не влияли на термостабильность химерного белка. Полученное авторами настоящего изобретения биспецифическое антитело E17-Дизайн_2-QQQQ имело T_m , схожую с Дизайн_2-QQQQ, и более низкую T_m , чем нативное T3.

Таблица 33

Термостабильность сконструированного химерного и биспецифического антитела, измеряемая посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF)

Название белка НС/LC (антитело против CD3)/НС/LC (антитело против CD19)	Изотип	Концентрация (мг/мл)	T _{on} (°C)	T _{h 1} (T _m) (°C)	T _{h 2} (°C)	pI	Чистота
T3	IgG1	2,7	57	74,2	Не определено	8,31	99,41%
Дизайн_2 (SEQ ID NO: 4/3/4/3)	IgG1	1,6	46	59,3	Не определено	6,07	93,09%
Дизайн_2-QQQQ (SEQ ID NO: 13/12/13/12)	IgG1	1,1	45	59,1	Не определено	6,07	99,03%
E17-Дизайн_2- QQQQ (SEQ ID NO: 22/12/24/23)	IgG1	0,3	49	61,9	76,2	7,29	98,63%
T3	IgG4	1,4	53	65	73,2	8,24	96,06%
Дизайн_2-QQQQ (SEQ ID NO: 21/12/21/12)	IgG4	0,9	45	58,4	Не определено	5,7	96,05%
E17-Дизайн_2- QQQQ (SEQ ID NO: 25/12/26/23)	IgG4	0,8	47	60,2	72,7	6,4	100%

Пример 12. Материалы и способы.

Гомологичное моделирование Fv антитела T3.

Структурную модель антитела Fv строили с учетом аминокислотных последовательностей Fv с использованием программного обеспечения Discovery Studio (BIOVIA). Сначала последовательности легкой и тяжелой цепи аннотировали в соответствии с нумерацией по Kabat для идентификации трех CDR, а также каркаса каждой цепи. Затем каждый сегмент (CDR или каркас) подвергали поиску BLAST в базах данных антител с использованием последовательностей всех структур антител в PDB. Для построения гомологичной модели использовали структуру наиболее совпадающей последовательности, если она имеет высокое разрешение и низкий B-фактор. Затем все смоделированные сегменты собирали для конструирования структурной модели легкой и тяжелой цепи. Относительную ориентацию двух смоделированных цепей прогнозировали, используя угол структуры антитела, имеющей наиболее схожую общую последовательность. Всю молекулярную визуализацию и аналитическую работу осуществляли с использованием программного обеспечения PyMOL (Schrödinger).

Векторные конструкции.

Гены VL, VH, Cκ, CH1 амплифицировали посредством ПЦР с использованием существующих матриц ДНК собственной разработки. Гены C-альфа и C-бета синтезировали в Genewiz Inc. Гены нативной или химерной легкой цепи встраивали в линейаризованный вектор, содержащий промотор CMV и сигнальный пептид каппа-цепи. Фрагменты ДНК VH-CH1 или VH-C-бета встраивали в линейаризованный вектор, содержащий константную область CH2-CH3 IgG4/IgG1 человека. Вектор содержит промотор CMV и сигнальный пептид тяжелой цепи антитела человека. Лигирование плазмид, трансформацию, получение ДНК осуществляли стандартными способами молекулярной биологии. Сайт-специфический мутагенез осуществляли посредством ПЦР-амплификации с использованием мутагенных праймеров с последующим расщеплением ДНК-матрицы с помощью DpnI.

Экспрессия белка.

С помощью сконструированных векторов для тяжелой цепи и легкой цепи котрансфицировали клетки Expi293 (ThermoFisher Scientific). Соотношение разных векторов для котрансфекции корректировали в соответствии с ожидаемой структурой антител и результатом исходной экспрессии, определенном посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS. В кратком изложении, 40 мкг плазмиды и

108 мкл ExpiFectamine использовали для трансфекции 40 мл $1,2 \times 10^8$ клеток. Через 20 ч после трансфекции добавляли Enhancer 1 и Enhancer 2. Трансфицированные клетки культивировали при 37°C с 8% CO₂ на орбитальном шейкере при 120 об/мин. Через пять дней после трансфекции супернатанты собирали посредством центрифугирования и удаляли фрагменты клеток с помощью фильтра 0,22 мкм.

Детекция экспрессии посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS.

Супернатант, собранный в 5-й день, смешивали с буфером для образцов NuPAGE LDS (4-кратным), восстановителем для образцов NuPAGE (10-кратным) и H₂O. Восстановленные образцы нагревали при 75°C перед нанесением на гель. Электрофорез проводили при постоянном напряжении 200 В в течение 35 мин. Затем гели окрашивали SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, LC6065) и помещали в микроволновую печь на 5 мин. Обесцвечивание осуществляли посредством инкубации с водой и обработки в микроволновой печи в течение 7 мин. Изображения гелей получали с использованием Universal Hood III (BioRad).

Очистка.

Очистка посредством хроматографии с протеином А.

Смолы с протеином А MabSelect™ SuRe™ (MSS) получали от GE Healthcare и упаковывали в стеклянные колонки (BioRad). Очистку посредством хроматографии с протеином А осуществляли при комнатной температуре с использованием перистальтического насоса при скорости потока 0,2 мл/мин. После введения образцов для элюции использовали 10 объемов колонки 100 мМ глицина, pH 3,5, и собирали разные фракции. Концентрацию белка в разных фракциях измеряли с использованием NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Чистоту белка определяли посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и SEC-ВЭЖХ.

Ионообменная хроматография (ТЕС).

Эксперименты с ИЕС осуществляли с использованием колонки HiTrap SP HP 1 мл от GE Healthcare Life Sciences и системы АКТА Pure (GE Healthcare). Программируемые параметры способа являлись следующими: промывка колонки 10 CV промывочного буфера А (10 мМ NaH₂PO₄, pH 6,0); введение образца с использованием впускного отверстия для образцов; уравнивание колонки 10 CV промывочного буфера А (10 мМ NaH₂PO₄, pH 6,0); элюция колонки промывочным буфером А и промывочным буфером В (10 мМ NaH₂PO₄, 1 М NaCl, pH 6,0). Условия элюции в градиенте использовали в виде линейной стадии с 50 CV с использованием 30% промывочного буфера В, линейной стадии с 5 CV с использованием 100% промывочного буфера В и стадии с наполнением 10 CV с использованием 100% промывочного буфера В. Фракции собирали в виде 0,5 мл на пробирку в соответствии со значением поглощения УФ (пороговое значение при сборе устанавливали на 5 мЕА).

Эксклюзионная хроматография (SEC).

Хроматографические эксперименты осуществляли с использованием колонки Superdex™ 200 Increase 10/300 GL и системы АКТА от GE Healthcare Life Sciences. Эксперимент проводили с использованием PBS (137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 1,76 мМ KH₂PO₄, 10 мМ Na₂HPO₄, pH 7,0) при 0,5 мл/мин. Фракции собирали с использованием автоматизированной программы для сбора (значение поглощения УФ для сбора устанавливали на 5 мЕА) при объеме каждой фракции 0,5 мл.

Очистка посредством хроматографии с Ni Sepharose™ Excel.

Очистку меченого 6xHis белка осуществляли с использованием хроматографических смол Ni Sepharose™, приобретенных в GE Healthcare. Смолу упаковывали в стеклянные колонки (BioRad). После промывки колонки 10 объемами колонки (CV) ddH₂O для удаления буфера для консервации смолы, ее использовали для очистки меченых 6xHis белков. В кратком изложении, очистку с помощью колонки с Ni-сефарозой осуществляли при комнатной температуре с использованием перистальтического насоса при скорости потока 0,2 мл/мин. После введения образца для промывки использовали 10 CV PBS (50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,0), затем 5 CV элюирующего буфера 1 (50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,0) для удаления слабо связанного белка. Для элюции связанного белка использовали 10 CV элюирующего буфера 2 (50 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,0). После элюции собранный белок измеряли с использованием NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Чистоту элюированного белка определяли посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и SEC-ВЭЖХ. Колонку регенерировали с использованием 10 CV ddH₂O, 10 CV буфера для стрипирования (50 мМ Трис, 500 мМ NaCl, 50 мМ ЭДТА, pH 7,4) для санации, 10 CV 6 М гидрохлорида гуанидина, pH 7,4, и 10 CV 0,1 М сульфата никеля. Регенерированную колонку наполняли 20% этанолом и хранили при 4°C.

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (SEC-ВЭЖХ).

Чистоту образцов анализировали с использованием колонки TSK-GEL G3000SWXL (7,8 мм × 300 мм) от Tosoh Bioscience и системы для ВЭЖХ Agilent 1200 (Agilent Technologies). Колонку уравнивали фосфатным буфером (50 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,0) при скорости потока 1,0 мл/мин. После фильтрации и впрыскивания образца белка объемом 50 мкл осуществляли мониторинг поглощения УФ при 280 нм. Чистоту оценивали посредством интегрирования хроматограммы.

Измерение концентрации антител посредством ELISA.

Планшеты для ELISA покрывали 200 нг/мл (Fab)₂-формы антитела козы против Fc IgG человека в

покрывающем буфере (200 мМ Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,2). После инкубации в течение ночи при 4°C планшеты однократно промывали буфером PBS с использованием устройства Deep-Well Washer (Biotek ELx405). Затем планшеты блокировали 2% BSA в буфере PBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты 3 раза промывали промывочным буфером и добавляли антитело положительного контроля и разбавленные образцы. После 2-часовой инкубации планшеты промывали 6 раз 300 мкл промывочного буфера и добавляли биотинилированное антитело козы против Fc Ig человека (Bethyl, 100 мкл/лунку, разведение 1:5000 в 2% BSA) в качестве детекторного антитела. После стадий инкубации и промывки добавляли SA-HRP (Invitrogen, разведение 1:8000 в 2% BSA). Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре еще в течение 1 ч. Планшеты промывали 6 раз с помощью 300 мкл/лунку промывочного буфера. Добавляли субстрат ТМВ и проявляли в течение 10 мин. Добавляли стоп-раствор (2 М HCl, 100 мкл/лунку) для прекращения дальнейшего проявления окрашивания и измеряли поглощение при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения планшетов (Molecular Device Spectra-Max® M5e).

Анализы связывания мишени.

Связывающую способность сконструированных молекул оценивали с использованием CD3⁺ клеток Jurkat и CD19⁺ клеток Ramos, соответственно. Обе линии клеток получали в American Type Culture Collection (ATCC) и поддерживали в среде RPMI 1640 (Invitrogen, кат. № 22400105), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS, Corning, кат. № 35-076-CV).

Аликвоты по 10⁵ клеток на лунку собирали и промывали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA, VovoGen-BSAS) с последующей инкубацией с серийно разведенными исследуемыми антителами в 96-луночном круглодонном планшете (Corning, кат. № 3799) при 4°C в течение 1 ч. После двукратной промывки 1% BSA планшеты дополнительно инкубировали с PE-конъюгированным антителом козы против Fc IgG человека (Jackson Immuno Research Laboratories, кат. № 109-115-098) при 4°C в течение 30 мин. После того как планшеты снова дважды промывали, клетки анализировали посредством проточной цитометрии с использованием цитометра FACSCanto II (BD Biosciences) и соответствующую интенсивность флуоресценции количественно анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Для получения значений EC₅₀ использовали четырех-параметрический нелинейный регрессионный анализ в программном обеспечении GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Направляемый биспецифическими антителами цитолиз опухолевых клеток.

Для получения Т-клеток человека мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) здоровых доноров выделяли из гепаринизированной венозной крови посредством центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare-17-1440-03). После культивирования в среде RPMI 1640, дополненной 10% FBS, 1% раствором пенициллина/стрептомицина (ScienCell, кат. № 0503), 50 ед. на мл белка-лиганда ИЛ-2 человека и 10 нг/мл антитела ОКТ3 (EBioscience, кат. № 16-0037-85), в течение 6 дней PBMC пропускали через колонки EasySep (Stemcell, кат. № 19053) для обогащения CD8⁺ Т-клеток. CD8⁺ Т-клетки из колонок для отрицательной селекции использовали в качестве эффекторных клеток.

В анализе цитотоксичности CD19⁺ клетки Raji в качестве клеток-мишеней предварительно метили с использованием 20 нМ CellTrace Far Red (Invitrogen, кат. № C34564) при 37°C в течение 30 мин. Затем клеточные осадки дважды промывали средой RPMI 1640 без фенола (Invitrogen, кат. № 11835030), дополненной 10% FBS. Окрашенные Far Red-stained В-клетки Raji (20000 клеток/лунку) инкубировали в 96-луночном круглодонном планшете (Corning, кат. № 3799) с выделенными CD8⁺ Т-клетками (соотношение мишень/эффекторная клетка 1:5) и серийно разведенными биспецифическими антителами при 37°C в течение 4 ч. После инкубации добавляли 3 мкМ йодида пропидия (PI, Invitrogen, кат. № P3566) и тщательно смешивали для идентификации погибших клеток. Через 15 мин клетки анализировали посредством проточной цитометрии с использованием цитометра FACSCanto II. Опосредованную биспецифическим антителом цитотоксичность можно определять как процентную долю PI-положительных клеток-мишеней среди Far Red-положительных клеток-мишеней. EC₅₀ цитотоксичности Т-клеток определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Характеризация посредством масс-спектрометрии.

Белок разводили до 0,4 мг/мл и дегликозилировали посредством инкубации с 1 мкл ПНГазы F (Glyco, GKE-5006D) (соотношение белка и фермента 40:1) в 100 мкл 20 мМ буфера Трис (pH 8,0) при 37°C в течение по меньшей мере 4 ч. Аликвоту дегликозилированных биспецифических антител частично восстанавливали посредством добавления 2 мкл 1М DTT до конечной концентрации 20 мМ при комнатной температуре в течение 15 мин. Каждый образец в количестве 2 мкг впрыскивали в колонку Acquity UPLC VEN300 C4 (2,1×100 мм, 1,7 мкм) при 0,4 мл/мин. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиной кислоты (FA) в воде категории ВЭЖХ. Подвижная фаза В представляла собой 0,1% FA в ацетонитриле. В случае невозможности восстановления и восстановительных условий использовали эффективный градиент элюции от 24% В до 34% В в течение от 3,0 до 15,0 мин. После разделения с помощью RP UPLC массу биспецифического белка в невозможности восстановления и восстановительных условиях определяли

с помощью Waters Xevo G2 Q-TOF. Сигналы MS подвергали деконволюции с использованием программного обеспечения BiopharmaLynx 1.3. Теоретические усредненные по массе молекулярные массы компонентов легкой цепи и тяжелой цепи определяли с использованием программного обеспечения GPMaw (v. 6.00).

Тестирование термостабильности посредством DSF.

Анализ DSF осуществляли с использованием системы для ПЦР в реальном времени 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). В кратком изложении 19 мкл раствора антитела смешивали с 1 мкл 62,5-кратного раствора SYPRO Orange (Invitrogen) и наносили на 96-луночный планшет (Biosystems). Планшет нагревали с 26°C до 95°C со скоростью 2°C/мин и собирали получаемые данные о флуоресценции. Вычисляли отрицательные производные изменений флуоресценции в отношении разных температур и максимальное значение определяли как температуру плавления T_h . Если белок имеет множество конформационных переходов с разворачиванием, регистрировали первые две T_h и обозначали их как T_{h1} и T_{h2} . $T_{h2} - T_{h1}$ всегда интерпретируют как формальную температуру плавления T_m для облегчения сравнения разных белков. Сбор данных и вычисление T_h осуществляли автоматически с помощью программного обеспечения. После построения графика отрицательных производных разных температур с помощью программного обеспечения, точку на графике, в которой кривая начинает снижаться относительно базового уровня до перехода, можно приблизительно принимать за температуру начала перехода T_{on} .

Пример 13. Идентификация О-гликанов.

При предшествующей масс-спектрометрии в легкой цепи TCR-модифицированного T3 обнаруживали О-гликаны. В отличие от участков N-гликозилирования, которые можно локализовать с учетом паттернов аминокислотной последовательности, участки О-гликозилирования трудно прогнозировать с учетом последовательности. Эта TCR-химерная легкая цепь T3 состояла из V-области родительского антитела T3, а также константной области альфа-цепи TCR. Обе области потенциально могут иметь Участки О-гликозилирования. Снова осуществляли масс-спектрометрический анализ исходного моноклонального антитела T3 и обнаруживали, что это родительское антитело не содержало О-гликаны, что свидетельствует о том, что О-гликаны локализовались с константной области альфа-цепи TCR.

Известно, что О-гликозилирование, главным образом, происходит на остатках Ser или Thr, и в последовательности константной области альфа-цепи TCR есть 21 остаток Ser/Thr (показаны полужирным шрифтом в последовательности ниже). Для определения точного положения участков О-гликозилирования осуществляли аланиновое сканирование Ala для замены каждого отдельного Ser/Thr на Ala, и конструировали 21 TCR-модифицированную моноспецифическую молекулу T3. Потенциальные О-гликаны на каждом мутанте высвобождали из белка, метили 2-аминобензойной кислотой и количественно анализировали посредством ВЭЖХ с использованием датчика флуоресценции. Потеря сигнала О-гликанов может служить в качестве средства определения локализации участка О-гликозилирования.

1 1121 3141

PDIQNPDPAY YQLRDSKSSD KSVCLFTDFD SQTQVSQSKD SDVYITDKCV

5161718191

LDMRSMDFKS NSAVAWSQKS DFACANAFQN SIIPEDTFFP SPES

(SEQ ID NO:411)

Для идентификации и анализа количества О-гликанов разрабатывали способ кислотного гидролиза и способ ВЭЖХ. Образец гидролизовали с помощью 2 М TFA (трифторуксусной кислоты) и высвобождали моносахарид О-гликана. Высвобожденный GalN (галактозамин) из GalNAc (N-ацетил-D-галактозамина) О-гликана и Gal (галактозу) метили 2-аминобензойной кислотой, анализировали посредством ВЭЖХ с использованием FLD (датчика флуоресценции) и количественно анализировали с помощью внешней калибровочной кривой. Содержание высвобожденного GalN напрямую коррелировало с количеством О-гликана, т.к. он является моносахаридом, специфическим для О-гликанов. Результаты приведены в виде количества моль GalN на моль белка, что соответствует тому, что один моль белка содержит количество моль О-гликанов.

В табл. 34 приведены уровни О-гликанов на всех мутантах. В качестве контрольного белка использовали биспецифическую молекулу E17-Дизайн_2-QQQQ. Данные свидетельствовали о том, что было 0,24 моль доступных О-гликанов на каждый моль белка E17-Дизайн_2-QQQQ. Т.к. это биспецифическое антитело содержит только TCR-модифицированную легкую цепь T3, общий уровень О-гликанов двух цепей необходимо удваивать, т.е. он составляет приблизительно 0,48 моль/моль. Среди всех 21 мутанта большинство сохраняло ожидаемое количество О-гликанов. Образцы #3, #8, #10 и #20 демонстрировали небольшое снижение сигнала. Образец #19 демонстрировал очевидную утрату О-гликанов. Сигнал был даже ниже сигнала контрольного белка. Таким образом, положение S91 идентифицировали как основной участок О-гликозилирования. S19, S36, S41 и S94 идентифицировали как возможные участки О-гликозилирования.

Таблица 34

Количественно проанализированные О-гликаны на различных мутантах с единичными Ala (нумерация остатков приведена на фиг. 19А)

№ проекта		WBP3438	Аналитический №	AS1803474
Исследуемый образец		Анализ моносахаридов	№ SOP	PD-PAS-LAB-090-02
№ образца	ID образца	Результаты теста (моль/моль белка)		
		Галактозамин		
196388	E17-Дизайн_2-QQQQ	0,24 (x2)		
1	T3.uIgG4.SP(S16A)	0,41		
2	T3.uIgG4.SP(S18A)	0,43		
3	T3.uIgG4.SP(S19A)	0,38		
4	T3.uIgG4.SP(S22A)	0,45		
5	T3.uIgG4.SP(T27A)	0,57		
6	T3.uIgG4.SP(S31A)	0,44		
7	T3.uIgG4.SP(T33A)	0,42		
8	T3.uIgG4.SP(S36A)	0,36		
9	T3.uIgG4.SP(S38A)	0,47		
10	T3.uIgG4.SP(S41A)	0,37		
11	T3.uIgG4.SP(T46A)	0,50		
12	T3.uIgG4.SP(S55A)	0,43		
13	T3.uIgG4.SP(S60A)	0,53		
14	T3.uIgG4.SP(S62A)	0,56		
15	T3.uIgG4.SP(S67A)	0,57		
16	T3.uIgG4.SP(S70A)	0,52		
17	T3.uIgG4.SP(S81A)	0,53		
18	T3.uIgG4.SP(T87A)	0,55		
19	T3.uIgG4.SP(S91A)	0,12		
20	T3.uIgG4.SP(S94A)	0,32		
21	T3.uIgG4.SP(S95A)	0,61		

Пример 14. Связывание с рецептором Fcγ, C1q и FcRn.

Способы.

Аффинность связывания с рецептором Fcγ по результатам SPR.

Аффинность связывания антитела с FcγR определяли с использованием Biacore T200 (или Biacore 8K). Каждый рецептор фиксировали на сенсорном чипе CM5 с иммобилизованным антителом против His (GE). Антитела в разных концентрациях впрыскивали на сенсорный чип при скорости потока 30 мкл/мин в течение фазы ассоциации 60 с с последующей диссоциацией в течение 60 с. Затем чип регенерировали с помощью 10 mM глицина (pH 1,5) после каждого цикла связывания.

Из тестовых сенсограмм вычитали сенсограммы для контрольной поверхности и канала буфера. Данные эксперимента аппроксимировали с помощью модели 1:1 с использованием анализа по Ленгмюру (в случае FcγR1) или равновесной модели (в случае других рецепторов). Для вычисления молярной концентрации антител использовали молекулярную массу 150 кДа.

Связывание с C1q по результатам ELISA.

Планшеты для ELISA (Nunc) покрывали образцами антител в концентрации 3 мкг/мл в течение ночи при 4°C. После блокирования и промывки C1q серийно разводили, начиная с 600 мкг/мл, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем планшеты промывали и инкубировали с HRP-конъюгированным антителом овцы против C1q человека в течение 1 ч. После промывки добавляли субстрат ТМВ и останавливали реакцию добавлением 2 М HCl. Поглощение при 450 нм регистрировали с использованием спектрофотометр для чтения микропланшетов (Molecular Device).

Аффинность связывания с FcRn по результатам SPR.

Аффинность связывания антитела с FcRn определяли с использованием Biacore T200 (или Biacore 8K). Каждое антитело иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE). FcRn в разных концентрациях в подвижном буфере (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 150 mM NaCl, 0,05% Tween20, pH 6,0) впрыскивали на сенсорный чип при скорости потока 30 мкл/мин в фазу ассоциации в течение 60 с с последующей диссоциацией в течение 60 с. Затем чип регенерировали с помощью 1-кратного PBS (pH 7,4) после каждого цикла связывания.

Из тестовых сенсограмм вычитали сенсограммы контрольной поверхности и канала буфера. Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью равновесной модели. Молекулярную массу 45 КДа использовали для вычисления молярной концентрации FcRn.

Результаты.

Т.к. все упомянутые выше IgG1 являлись IgG1 с мутацией LALA, активность связывания E17-Дизайн_2-QQQQ в форме IgG4 и IgG1 дикого типа (T3U4.E17-2.(2).uIgG1 (IgG1 дикого типа с "выступами-во-впадины")) с FcγRI, FcγRIIa (H167), FcγRIIa(R167), FcγRIIb, FcγRIIIa (F176), FcγRIIIa (V176) и FcγRIIIb исследовали посредством SPR.

Соответствующие последовательности конструкции T3U4.E17-2.(2).uIgG1 приведены ниже.

T3U4.E17-2.(2).uIgG1	U4-LC (SEQ ID NO: 371)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVNYMHWYQQKP GKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCHQWSSYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFFPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
	U4-HC (SEQ ID NO: 372)	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYAFTSYNMYWV RQARGQRLEWIGYIDPYNGDITYNQKFKGRVITITRDMST STAYMELSSLRSEDVAVYYCLTAYAMDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	T3-LC (SEQ ID NO: 373)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNRSRTRKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDFRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRTFGGGTKVEIKPDIQNP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSVYIT DKCVLDMRSMDFKNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIPE DTFFPSPESS
	T3-HC (SEQ ID NO: 374)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFAFTDYYIHWVR QAPGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVITITADKST STAYMELSSLRSEDVAVYYCARDGYSLYYFDYWGQGLT VTVLEDLKLVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRY ALSSRLRVSATFWQNPVRFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRASDKTHTCPPCPAPELGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
		EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

Аффинности приведены в табл. 35 (IgG4) и 36 (IgG1 дикого типа). Обе молекулы демонстрировали типичную аффинность связывания IgG4 и IgG1 дикого типа человека со всеми рецепторами Fcγ.

Таблица 35

Аффинность IgG4 к Fc-рецептору по результатам SPR

Fc-рецептор	K _D (M)
FcγRI	9,79E-09
FcγRIIa (H167)	2,05E-05
FcγRIIa (R167)	1,58E-05
FcγRIIb	2,41E-05
FcγRIIIa (F176)	2,93E-05
FcγRIIIa (V176)	1,40E-05
FcγRIIIb	>4,10E-05

Таблица 36

Аффинность IgG1 дикого типа к Fc-рецептору по результатам SPR

Fc-рецептор	K _D (M)
FcγRI	1,30E-09
FcγRIIa (H167)	3,58E-06
FcγRIIa (R167)	4,83E-06
FcγRIIb	8,07E-06
FcγRIIIa (F176)	2,08E-06
FcγRIIIa (V176)	6,44E-07
FcγRIIIb	5,16E-06

Активность связывания антител с C1Q тестировали посредством ELISA (фиг. 21A-21B). E17-Дизайн_2-QQQQ в форме IgG4 не проявлял сигнал связывания при ELISA (фиг. 21A), в то время как E17-Дизайн_2-QQQQ в форме IgG1 дикого типа и контрольное антитело IgG1 человека демонстрировали нормальный сигнал связывания (фиг. 21B).

Пример 15. Симметричные форматы G19, G19R, G25, G25R.

В случае мишеней терапевтических средств на основе антител, подобных CD3×CD19, биспецифическое антитело с моновалентным связыванием CD3 будет благоприятным по причинам, связанным с безопасностью. Учитывая это, конструировали и успешно получали асимметричные биспецифические форматы E17 и F16 посредством встраивания Fab WuXiBody, а также способов с использованием "выступов-во-впадины". Однако, в случае некоторых мишеней биспецифических антител, подобных CTLA-4×PD-1, благоприятным для достижения желаемых синергических эффектов будет симметричный формат, в котором могут собираться два разных антитела при сохранении их исходных валентностей (т.е. в целом, тетравалентный). Коровая единица WuXiBody представляет собой химерный Fab, который легко можно включать в асимметричные и симметричные форматы для обеспечения правильного спаривания когнатных легких и тяжелых цепей. Конструировали четыре симметричных формата на основе WuXiBody, названные G19, G19R, G25 и G25R.

На фиг. 22 показана схема четырех симметричных форматов. В G19 и G25 два химерных Fab WuXiBody пересаживали на C-конец и N-конец нормального антитела, соответственно. Различием между G19 и G19R или между G25 и G25R является обратная локализация нормального и химерного Fab в каждом отдельном формате. Тяжелые части двух Fab, а также Fc IgG встраивали в одну цепь, в то время как легкие цепи могли свободно сворачиваться и независимо собираться. Когда с помощью трех векторов котрансфицировали клетки-хозяева, ожидали, что при экспрессии будет происходить связывание между тяжелыми цепями, подобно нормальным антителам, в то время как каждая легкая цепь будет самостоятельно собираться с собственным когнатным партнером на тяжелой цепи.

Конструировали биспецифические антитела против CTLA-4×PD-1 в симметричном формате WuXiBody. Для включения в новые форматы использовали новое антитело против PD-1 W30551.153.7 (названное U6) и коммерческое антитело против CTLA-4 ипилимумаб (названное T1). Для обеспечения устранения эффекта ADCC и CDC в отношении молекулы выбирали изотип IgG4. Т.к. U6 и T1 можно располагать в верхней или нижней части формата (обозначены как U6T1 и T1U6, соответственно), для исследования обоих вариантов сначала использовали единый формат G19.

Соответствующие последовательности тестируемого WuXiBody приведены ниже.

Образцы	SEQ ID NO плазмиды	Последовательности
T1U6.G19.I gG4	T1-LC (SEQ ID NO: 375)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
	T1-U6- HC (SEQ ID NO: 376)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQA PGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGFDFYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSGG GGSGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSHAMS WVRQAPGKLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQD SRYALSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTVQIVSAEAWGR
	U6-LC (SEQ ID NO: 377)	SYELTQPLSVSVALGQATARITCGGDNIGNKDVHWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGNSGNTATLTISRAGAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLPDIQNPDPVAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDP KNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS
U6T1.G19.I gG4	U6-LC (SEQ ID NO: 378)	SYELTQPLSVSVALGQATARITCGGDNIGNKDVHWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGNSGNTATLTISRAGAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPS KQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
	U6-T1- HC (SEQ ID NO: 379)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMS WVRQAP GKLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPK

		DTLMISRTPVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSG GGSGGGGGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQD SRYALSSRLRVSATFWQNPVNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVVTQIVSAEAWGR
	T1-LC (SEQ ID NO: 380)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFA VYYCQYQYSSPWFQGTKEIKPDIQNPDPVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTQVVSQKSDSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
U6T1.G19 R.IgG4	U6-LC (SEQ ID NO: 381)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGNKDVHWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEFGSGNSGNTATLTISRAGAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLPDIQNPDPVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQKSDSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
	U6-T1- HC (SEQ ID NO: 382)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW VWNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPVNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVVTQIVSAEA WGRYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTC CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWV

		RQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRV
	T1-LC (SEQ ID NO: 383)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
U6T1.G25.I gG4	U6-LC (SEQ ID NO: 384)	SYELTQPLSVSVALGQATARITCGGDNIGNKDVHWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGSNGNTATLTISRAQAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGKLTLPDIQNPDAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS
	U6-T1- HC (SEQ ID NO: 385)	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPРНFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEA WGRGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGF TFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYYADSVK RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNNHYT QKSLSLSLGK

	T1-LC (SEQ ID NO: 386)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPG QAPRLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
U6T1.G25 R.IgG4	U6-LC (SEQ ID NO: 387)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGNKDVHWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGNSGNTATLTISRAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
	U6-T1- HC (SEQ ID NO: 388)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVGGGGGGGGGQVQLVESGGGVVQPRSL RLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKLEWVTFISYDGNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCART GWLGPFDYWGQGLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPL KEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPVRFRCQVQFYGL SENDEWTQDRAKPVTVSAAEAWGRYGPPCPPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK
	T1-LC (SEQ ID NO: 389)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPG QAPRLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKPDIQNPDPVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTQVSKSDSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS

U6T4.G26.1 gG4	U6-LC (SEQ ID NO: 390)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGNKDVHWHYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLPDIQNPDPVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KSNNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPSS
	U6-HC- T4-LC (SEQ ID NO: 391)	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRGGGSGGGSDIVMTQTPLSL SVTPGQPASISCRSSQSL LNSDGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYLVSKLGSVGNRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCVQGTHDPWTFGGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	T4-HC (SEQ ID NO: 392)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVTYHTITSGYDWTWIRKPP GKGMIEWIGYISYSGNTNYPNPSLKRVTISRDTSKNQFFLKLS SVTAADTAVYYCASMMPHYVMDAWGQGLTVTVSSAST KGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
U6T5.G19.1 gG4	U6-LC (SEQ ID NO: 393)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGNKDVHWHYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPSPSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS

	U6-T5- HC (SEQ ID NO: 394)	EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGGTLVTVSSAS TKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGSG GGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YFTFTNYFMNWRQAPGGLEWMGRVDPEQGRADYAEKF KKRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRAMDNY GFAYWGQGLVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQP ALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPVNFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGR
	T5-LC (SEQ ID NO: 395)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSANSALSYMYWYQKPKDQ SPKLWVHGTSNLAGVPSRFGSGSGTDFTLTINSLEAEDAA TYYCHHSNTQWTFGGGKVEIKPDIQNPDPVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
U6T5.G19 R.IgG4	U6-LC (SEQ ID NO: 396)	SYELTQPLSVSVLQGTARITCGGDNIGNKDVHWYQKPKG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGNSGNTATLTISRAQAGDE ADYYCQVWDSIWFVGGGKTLTVLPDIQNPDPVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
	U6-T5- HC (SEQ ID NO: 397)	EVQLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGGTLVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPVNFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEA WGRYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

		<p>CVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPVVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGGGGGGGGGGGGGGGGGG GGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTNYFMNW VRQAPGQGLEWMGRVDPEQGRADYAEKFKKRVTTITADKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARRAMDNYGFAYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTK YTCNVDPKPSNTKVDKRV</p>
	<p>T5-LC (SEQ ID NO: 398)</p>	<p>EIVLTQSPDFQSIVTPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQKPKDQ SPKLWVHGTSNLASGVPSRFSGSGGTDFLTINSLEAEDAA TYCHHWSNTQWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p>
<p>U6T5.G25.1 gG4</p>	<p>U6-LC (SEQ ID NO: 399)</p>	<p>SYELTQPLSVSVALGQATARITCGGDNIGNKDVHWWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGSNSGNTATLTISRAQAGDE ADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLPDIQNPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS</p>
	<p>U6-T5- HC (SEQ ID NO: 400)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDNAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEA WGRGGGGGGGGGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YFTFTNYFMNWVRQAPGQGLEWMGRVDPEQGRADYAEK KKRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARRAMDNY GFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVTPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQED</p>

		PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLGK
	T5-LC (SEQ ID NO: 401)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQKPDQ SPKLWVHGTSNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAA TYYCHHWSNTQWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
U6T5.G25 R.IgG4	U6-LC (SEQ ID NO: 402)	SYELTQPLSVSVALGQATARITCGGDNIGNKDVHWWYQQKPG QAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGNSNGNTATLTISRAQAGDE ADYYCQVWDSIWFVGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS KQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKT VAPTECS
	U6-T5- HC (SEQ ID NO: 403)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSV KVSCKASGYFTFTNYFMNWVRQAPGQGLEWMGRVDPEQGR ADYAEKFKRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR RAMDNYGFAYWGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDP QPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPVNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRYGPCCPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLH GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNYHTQ KSLSLGK

	T5-LC (SEQ ID NO: 404)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQKPDQ SPKLWVHGTSNLAGVPSRFSGSGSDFTLTLINSLEAEDAA TYCHHWSNTQWTFGGGKVEIKPDIQNPDPVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDF KNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
T4U6.G27.1 gG4	T4-HC- U6-LC (SEQ ID NO: 405)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVYHTITSGYDWTWIRKPP GKGMIEWIGYISYSGNTNYPNLSKSRVTISRDTSKNQFFLKLS SVTAADTAVYYCASMMVPHYVMDAWGQGLTVTVSSAST KGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSG GGGGGGGGGGSSYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNI GNKDVHWYQQKPGQAPVLIYRDSNRPSGIPEFGSNGSN TATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLPDIQ NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYI TDKCVLDMRSMDFKNSNAVAWSQKSDFACANAFQNSIPE DTFFPSPESS
	U6-HC (SEQ ID NO: 406)	EVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEA WGR
	T4-LC (SEQ ID NO: 407)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLNSDGNTYLYWYL QKPGQSPQLLIYLVSKLGGVGNRFSGSGSDFTLKISRVE AEDVGVYYCVQGTHTDPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

T4U6.G26 R.IgG4	T4-HC- U6-LC (SEQ ID NO: 408)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVTYHTITSGYDWTWIRKPP GKGMIEWIGYISYSGNTNYPNPSLKRVTISRDTSKNQFFLKLS SVTAADTAVYYCASMMVPHYYVMDAWGQGLTVTVSSAST KGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVGGGGSGGGSSYELTQPLSVSVALGQTARI TCGGDNIGNKDVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPEGF SGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYYCQVWDSIWVFGGGTK LTVLPDIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQS KDSVDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSQKSDFA CANA FQNSIIPEDTFFSPPESS
	U6-HC (SEQ ID NO: 409)	EVQLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAP GKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDYWGQGLTVTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
	T4-LC (SEQ ID NO: 410)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLNSDGNTYLYWYL QKPGQSPQLLIYLVSKLGGVGNRFSGGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCVQGTHTDPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIAPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

Обе конструкции, U6T1 и T1U6, нормально экспрессировались в системе Expi293, и экспрессируемый белок достигал чистоты приблизительно 90% после одностадийной очистки посредством хроматографии с протеином А. На фиг. 23А-23В показана характеристика очищенных белков посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и SEC-ВЭЖХ. Затем, для исследования их связывающей способности, осуществляли клеточные анализы связывания с мишенями PD-1 и CTLA-4. На фиг. 24А-24В показано, что U6 и T1 проявляли сниженное связывание, если они находились в нижней части формата. Учитывая, что функция PD-1 имеет относительно большую важность, чем CTLA-4 (известно, что антитела против CTLA-4 имеют более тяжелые побочные эффекты), PD-1-связывающую часть располагают наверху для максимизации связывания U6 (т.е. в виде U6T1, а не T1U6) и для тестирования того, как оптимизировать связывание CTLA-4, связывающая часть для которого расположена внизу.

Дополнительно исследовали другие три формата WuXiBody G19R, G25 и G25R (показаны на фигуре 22). Кроме того, получали демонстрационное антитело АК-104 (Akeso Biopharma, Inc), являющееся биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4, используемым в клиническом испытании, и использовали его в качестве контроля для прямого сравнения.

Из-за важности функции PD-1, U6 оставляли в верхней части всех форматов для максимизации связывания PD-1, в то время как T1 оставляли в нижней части для реализации приемлемого связывания CTLA-4. Все сконструированные молекулы хорошо экспрессировались в Expi293 и легко достигали чистоты >90% после одностадийной очистки посредством хроматографии с протеином А. На фиг. 25А-25В показано, что очищенные белки охарактеризовывали посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, а также SEC-ВЭЖХ.

Затем осуществляли клеточные анализы связывания с PD-1 и CTLA-4 для проверки связывающей способности всех новых сконструированных молекул. На фиг. 26А-26В показано сравнение кривых связывания полученных конструкций и демонстрационного антитела. Данные свидетельствуют о том, что все белки имели связывание с PD-1, схожее с демонстрационным антителом. Кроме того, связывание CTLA-4 значительно улучшалось в случае форматов G25 и G25R и достигало уровня, сравнимого с демонстрационным антителом (≤ 2 раза). Однако формат G19R все равно плохо работал. Вероятно, G19 и G19R имеют общий недостаток, состоящий в том, что они предотвращают эффективное связывание T1.

Функции молекул дополнительно охарактеризовывали, исследуя их конкурентные свойства в отношении каждого лиганда двух мишеней, PD-L1 и CD80. На фиг. 27А-27В показано, что эти молекулы имеют свойства, сравнимые с демонстрационным антителом, в отношении конкуренции с PD-L1. Что

касается CTLA-4-связывающей части, формат G25R проявлял свойства, схожие с демонстрационным антителом, в отношении конкуренции с CD80. Другие два формата имели относительно более низкие результаты. Различие между G25 и G25R состоит в локализации константной области TCR. По-видимому, преобразование T1 в формат WuXiBody способствует активности T1, хотя T1 все еще располагали ниже U6. Это является хорошим примером того, что функциональные части можно подвергать эффективному скринингу посредством сканирования ограниченного количества форматов, полученных из WuXiBody.

Таким образом, получали функциональное биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4, схожее с демонстрационным антителом. Форматы WuXiBody являются универсальными, т.е. в эти форматы можно адаптировать любые новые антитела, и они будут выполнять свои функции. Если доступно хорошее родительское антитело, его можно использовать для получения молекулы, превосходящей демонстрационное антитело.

Для подтверждения этой концепции, разрабатывали другое антитело против CTLA-4 W3162_1.154.8-z35 (названное T5), имеющее гораздо более высокую аффинность, чем ипилиумаб, и воплотили его во всех четырех форматах G19, G19R, G25 и G25R, приведенных на фиг. 22. И снова, все новые конструкции хорошо экспрессировались в клетках Expi293, и их легко очищали посредством одностадийной хроматографии с протеином А. Чистота белков показана на фиг. 28А-28В.

Определяли и сравнивали связывание всех молекул U6T5, идентифицированной ранее молекулы U6T1.G25R, а также демонстрационного антитела. Результаты показаны на фиг. 29А-29В. PD-1-связывающая часть сохраняла исходные связывающие свойства, наблюдаемые ранее, т.к. никакие из антител против PD-1 не заменяли в каком-либо из форматов. Однако, что касается CTLA-4-связывающей части, все конструкции U6T5 (даже форматы G19 и G19R) демонстрировали связывание, очевидно превосходящее U6T1.G25R, а также демонстрационную молекулу. U6T5.G25 являлось наиболее активным среди всех новых белков, имеющим улучшенную в 1,6 раза EC₅₀ и в >3 раз улучшенные значения для верхней части по сравнению с демонстрационным антителом. Эту молекулу дополнительно охарактеризовывали посредством анализа двойного связывания ELISA и конкурентных анализов FACS. На фиг. 30 показано эффективное двойное связывание молекул с двумя мишенями одновременно. Данные, приведенные на фиг. 31А-31В, подтверждают, что U6T5.G25 имело значимо улучшенную способность к конкуренции с CD80 за CTLA-4. Это доказывает, что форматы WuXiBody являются в достаточной степени гибкими для включения разных родительских антител. Верхняя часть родительского антитела может быть достаточно консервативной и продуманной, когда молекулу включают в форматы WuXiBody.

Охарактеризовывали термостабильность молекул, охватывающих все четыре симметричных формата. Большинство молекул демонстрировали температуру плавления приблизительно 60°C (как показано в табл. 37), что соответствует асимметричному формату, описанному выше.

Таблица 37

Температуры плавления соответствующих антител в форматах WuXiBody

Название белка	Изотип	pI	Буфер	Концентрация (мг/мл)	T _{h1} (°C)	T _{h2} (°C)
T1U6.G19.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,92	PBS	1,3	60,8	69,9
U6T1.G19.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,92	PBS	0,9	59,1	72,8
U6T1.G25R.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	6,06	PBS	1,385	60,8	73,9
U6T5.G19.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,93	PBS	0,6	56,2	74,1
U6T5.G19R.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,87	PBS	1,2	63,4	-
U6T5.G25.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,93	PBS	0,7	63,4	-
U6T5.G25R.uIgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,99	PBS	0,5	57,2	74,1

Пример 16. Химерный Fab с переставленными легкими и тяжелыми цепями.

Успешно конструировали всего 111 потенциальных форматов на основе WuXiBody. Помимо E17, F16, G19, G19R, G25 и G25R, описанных выше, также конструировали несколько форматов TCR-химерного Fab с переставленными легкими и тяжелыми цепями. Их обозначали как G26, G26R и G27, как показано на фиг. 32. В этом случае использовали пару антител U6 и T4, где T4 представляло собой антитело против CTLA-4 WBP3162-1.146.19-z12. Пару T4U6 разрабатывали в формате G27 и G26R. На фиг. 33А-33В показан очищенный белок, охарактеризованный посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и SEC-ВЭЖХ. Хотя экспрессировали оба белка, T4U6.G27.IgG4 имел низкую чистоту, а T4U6.G26R.IgG4 имел правильную молекулярную массу и высокую чистоту. Связывающую способность последней из молекул охарактеризовывали посредством FACS. На фиг. 34А-34В показано, что это влияло на связывание PD-1, т.к. за него отвечает нижняя часть, в то время как CTLA-4-связывающая часть демонстрировала полное восстановление, т.к. она расположена наверху формата.

Пару U6T4 исследовали в формате G26. Успешно осуществляли стадии экспрессии и очистки, как

показано на фиг. 35А-35В. Осуществляли анализы связывания посредством ELISA и FACS, данные которых приведены на фиг. 36А-36D. Эти данные подтверждают, что химерный Fab с переставленными легкими и тяжелыми цепями все равно хорошо работает. Температура плавления этой молекулы составляет приблизительно 63,4, как показано в табл. 38.

Таблица 38

Температура плавления U6T4.G26.IgG4

Название белка	Изотип	pI	Буфер	Концентрация (мг/мл)	T _h 1 (°C)	T _h 2 (°C)
U6T4.G26.IgG4	IgG4, каппа, лямбда	5,93	PBS	0,8	63,4	-

Пример 17. Биспецифическое WuXiBody против CD13×CD19. Предпосылки. Биология мишени.

CD19 человека представляет собой трансмембранный белок типа I, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов (Carter et al., *Curr Dir Autoimmun*, 2004, 7:4-32). Он экспрессируется на большинстве В-клеток, но его не определяют на плазматических клетках, стволовых клетках или нормальных клетках миелоидного ростка (Tedder, *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5(10):572-577). CD19 участвует в установлении пороговых значений характерной передачи сигнала В-клеток посредством модуляции зависящей и независимой от В-клеточного рецептора (BCR) передачи сигнала (Wang et al., *Experimental Hematology & Oncology*, 2012, 1:36). CD19 экспрессируется более обширно, чем CD20. Профиль экспрессии CD19 сохраняется в В-клеточных злокачественных новообразованиях, охватывая все подтипы В-клеточной лимфомы от вялотекущих до агрессивных форм, а также хронический В-клеточный лимфоцитарный лейкоз и острый не-Т-клеточный лимфобластный лейкоз, и делая возможным таргетинг опухолей ранних В-клеток, таких как острый лимфобластный лейкоз (ALL), на которые нельзя воздействовать ритуксимабом. Исследовано несколько моноклональных антител против CD19 для терапии лимфомы (публикация патентной заявки США № 20140072587 А1, патент США № 8242252В2 и патент США № 8097703В2).

Т-клеточный корецептор CD3 представляет собой белковый комплекс, состоящий из четырех отдельных цепей, гамма-цепи CD3, дельта-цепи CD3 и двух эpsilon-цепей CD3. Четыре цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и дзета-цепью для генерирования сигнала активации в Т-лимфоцитах. TCR, дзета-цепь и молекулы CD3 составляют комплекс TCR, в котором TCR как субъединица распознает антиген и связывается с ним, и CD3 как субъединица передает сигнал антигенной стимуляции в путь передачи сигнала и, в конечном итоге, регулирует активность Т-клетки. Белок CD3 присутствует, по существу, во всех Т-клетках. Комплекс CD3-TCR модулирует функции Т-клеток во врожденном и адаптивном иммунном ответе, а также клеточные и гуморальные иммунные функции. Они включают элиминацию патогенных организмов и контроль роста опухоли с помощью широкого диапазона цитотоксических эффектов. Моноклональные антитела мыши против CD3 человека, такие как ОКТ3 (Kung et al., *Science*, 1979, 206: 347-9), представляли собой антитела против CD3 первого поколения, разработанные для лечения. Хотя ОКТ3 имеет сильную иммуносупрессорную активность, его клиническому использованию препятствуют серьезные побочные эффекты, связанные с иммуногенными и митогенными потенциалами (Chatenoud, *Nature Reviews*, 2003, 3:123-132). ОКТ3 индуцировало антиглобулиновый ответ, способствуя своему собственному клиренсу и нейтрализации (Chatenoud et al., *Eur. J. Immunol.*, 1982, 137:830-8). Кроме того, ОКТ3 индуцировало пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов *in vitro* и приводило к крупномасштабному высвобождению цитокинов *in vivo* (Hirsch et al., *J. Immunol*, 1989, 142: 737-43). Такие серьезные побочные эффекты ограничивали более широкое использование ОКТ3 при трансплантации, а также расширение его использования в других клинических областях, например, в отношении аутоиммунности (см. там же).

Биспецифическое антитело против CD3 и CD19 может одновременно связываться с Т-клетками и В-клетками. После связывания биспецифического антитела с CD3-положительной Т-клеткой и CD19-положительной В-клеткой образуется цитолитический синапс. Затем цитотоксичность индуцируется посредством высвобождения перфорина и гранзимов из гранул в цитотоксической Т-клетке, что индуцирует апоптоз и лизис злокачественной В-клетки.

Подтверждено, что активность блинагумаба не зависит от презентации антигена МНС класса I и распознавания TCR. Таким образом, он может преодолевать различные опухолевые механизмы ускользания от иммунного надзора, такие как нарушение механизма презентации антигена и активация отрицательных костимуляторных сигналов в микроокружении опухоли.

Нереализованные медицинские потребности.

Лечение острого лимфобластного лейкоза (ALL) у взрослых остается затруднительным, и необходимы новые способы терапии. В случае существующих способов терапии частота ответа находится в диапазоне от 30 до 50% в зависимости от длительности исходной ремиссии, возраста и цитогенетики. Общая частота ответа в случае подгруппы неходжкинской лимфомы (NHL) в настоящее время составляет более 90% при схемах лечения, в которых используют первое поколение антител против CD20. Однако некоторые подтипы NHL не отвечают на эти способы терапии, и у большей части пациентов с отве-

чающей NHL в конечном итоге развивается рецидив после стандартной комбинированной схемы лечения с использованием иммунотерапии/химиотерапии. Таким образом, для этих неудовлетворенных потребностей необходимы новые способы терапии первой линии и новые схемы терапии спасения.

Материалы и способы.

Получение CD19-экспрессирующей линии клеток яванского макака.

Ген полноразмерного CD19 человека или яванского макака клонировали в вектор pcDNA3.3. Затем с помощью каждого экспрессирующего вектора трансфицировали клетки CHO-K1 соответствующим образом с использованием Lipofectamine 2000. Клетки культивировали в F12-K с 10% FBS. Через 24-48 ч после трансфекции добавляли бластицидин. После 2-3 пассажей для селекции клетки обогащали с помощью PE-конъюгированного антитела против CD19 и микрочастиц против PE (Miltenyi-013-048-801). Стабильные клоны отдельных клеток выделяли способом предельных разведений и подвергали скринингу посредством FACS с использованием антитела против CD19.

Экспрессирующие мишень линии опухолевых клеток.

Клетки Raji и Jurkat получали из ATCC. Клетки Ramos получали из ECACC. Все опухолевые клетки культивировали в RPMI 1640/10% FBS.

Конструирование WuXiBodyW3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP и W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP.

Гены VL, VH, C κ , CH1 амплифицировали посредством ПЦР с использованием матриц ДНК собственного производства. Гены С-альфа и С-бета синтезировали в Genewiz Inc. Гены нативной легкой цепи против CD19 или химерной легкой цепи против CD3 встраивали в линейаризованный вектор, содержащий промотор CMV и сигнальный пептид каппа. Фрагменты ДНК VH-С-бета против CD3 встраивали в линейаризованный вектор, содержащий константную область CH2-CH3 IgG4 человека S228P с мутацией "выступа". Фрагменты ДНК VH-CH1 против CD19 встраивали в линейаризованный вектор, содержащий константную область CH2-CH3 IgG4 человека S228P с мутацией "впадины". Вектор содержит промотор CMV и сигнальный пептид тяжелой цепи антитела человека.

Экспрессия и очистка W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP и W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP.

С помощью экспрессирующих плазмид для тяжелой цепи и легкой цепи котрансфицировали клетки Expi293 с использованием набора экспрессионной системы Expi293 (Thermo Fisher-A14635) по инструкциям производителя. Через пять дней после трансфекции собирали супернатанты и очищали белок с использованием колонки с протеином А (GE Healthcare-17543802) и дополнительной эксклюзионной колонки (GE Healthcare-17104301). Концентрацию антитела измеряли с помощью Nano Drop. Чистоту белков оценивали посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и ВЭЖХ-SEC.

Связывание мишени по результатам FACS.

Связывание биспецифических антител с CD3- и CD19-экспрессирующими клетками оценивали с использованием клеток Jurkat и Ramos, соответственно. В качестве изотипического контроля использовали неродственное антитело. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (Corning-3799) при плотности 10^3 клеток/лунку и промывали PBS/1% BSA. Антитела серийно разводили и инкубировали с клетками при 4°C в течение 1 ч. Для детекции использовали PE-конъюгированное антитело козы против Fc IgG человека (Jackson-109-115-098). После промывки и ресуспендирования клетки анализировали посредством проточной цитометрии (Canto II, BD Biosciences). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo. Для вычисления значений EC₅₀ использовали четырех-параметрический нелинейный регрессионный анализ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Связывание с CD3 яванского макака.

Связывание биспецифического антитела против CD3×CD19 с CD3 яванского макака тестировали посредством анализа связывания белков ELISA. 96-луночные белок-связывающие планшеты для ELISA (Nunc MaxiSorp, ThermoFisher, Thermo-442404) покрывали 100 мкл 1 мкг/мл белка эpsilon-цепи CD3 яванского макака (Acro, #CDE-C5226) в карбонат-бикарбонатном буфере (20 mM Na₂CO₃, 180 mM NaHCO₃, pH 9,2) в течение ночи при 4°C. Все лунки однократно промывали 300 мкл PBS/0,5% Tween-20(об./об.) на лунку. Затем лунки блокировали 200 мкл PBS/2% BSA (BOVOGEN, #BSAS) на лунку в течение одного часа при комнатной температуре и три раза промывали 300 мкл PBS/0,5% Tween-20(об./об.) на лунку. Для связывания первичного антитела в соответствующие лунки добавляли биспецифическое антитело против CD3×CD19, серийно разведенное в PBS/2% BSA, и инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов. Планшеты три раза промывали, как описано выше, перед добавлением 100 мкл 100 нг/мл вторичного HRP-конъюгированного антитела козы против Fc IgG человека (Bethyl, #A80-304P). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа, затем шесть раз промывали, как описано выше. Для детекции связывания во все лунки добавляли 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (TMB) (Sigma-860336) на 10 мин при комнатной температуре в темноте перед остановкой реакции с помощью 100 мкл 2 M HCl. Степень связывания биспецифического антитела с CD3 яванского макака определяли посредством измерения поглощения OD450 с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов SpectraMax® M5e. В соответствующих случаях значения EC₅₀ связывания получали с помощью четырех-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5.

Связывание с CD19 яванского макака.

Связывание биспецифического антитела против CD3×CD19 с CD19 яванского макака, белком-мишенью, экспрессирующимся на клетках CHOK1, определяли посредством проточной цитометрии. В кратком изложении, гиперэкспрессирующую CD19 яванского макака, стабильную линию клеток (WBP701.CHOK1.cPro1.C9, WuXi Biologics) собирали с помощью трипсина и разводили до 1×10^6 клеток/мл в 1% BSA/1-кратном PBS. В каждую лунку 96-луночного планшета с U-образным дном (Corning, #3799) добавляли 1×10^5 клеток/лунку (100 мкл) и центрифугировали при 1500 об./мин. (Eppendorf, #5810R) в течение 5 мин перед удалением супернатанта. Антитела, серийно разведенные в 1% BSA/1-кратном PBS, добавляли в количестве 100 мкл/лунку к осажденным клеткам и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. В качестве изотипического контроля использовали неродственное антитело hIgG4. Клетки два раза промывали 180 мкл/лунку 1% BSA/1-кратного PBS посредством центрифугирования при 1500 об./мин. в течение 5 мин при 4°C. Осажденные клетки ресуспендировали в 100 мкл/лунку флуоресцентно меченого антитела против Fc IgG человека (Jackson, #109-115-098), разведенного в соотношении 1:150 в 1% BSA/1-кратного PBS, в течение 30 мин при 4°C в темноте. Затем клетки два раза промывали, как описано выше. После последней промывки клетки ресуспендировали в 80 мкл 1% BSA/1-кратного PBS и измеряли значения флуоресценции с помощью цитометра FACS Canto II (BD Biosciences). Поверхность клетки, связанную с биспецифическим антителом против CD19 и CD3, оценивали посредством измерения средней флуоресценции (MFI). Необработанные данные FACS анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo, для определения фоновой флуоресценции использовали лунки, не содержащие антитело или содержащие только вторичное антитело. Значения EC₅₀ связывания получали с помощью четырех-параметрического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5.

Аффинность по результатам FACS.

Аффинность связывания с CD3 и CD19 определяли посредством проточной цитометрии с использованием клеток Jurkat и Ramos, соответственно. Клетки переносили в 96-луночные планшеты с U-образным дном (BD) при плотности 5×10^4 клеток/лунку.

Антитела, подлежащие тестированию, серийно разводили в соотношении 1:2 в 1-кратном PBS/1% BSA и инкубировали с клетками при 4°C в течение 1 ч. Затем планшеты центрифугировали при 1500 об/мин в течение 4 мин и выбрасывали супернатант. К ресуспендированным клеткам добавляли вторичное антитело, Alexa647-конъюгированное антитело козы против Fc IgG человека (Jackson, кат. № 109-605-098) или FITC-конъюгированное антитело козы против His (Bethyl, кат. № A190-113F), и инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 мин. Клетки однократно промывали и ресуспендировали в 100 мкл 1-кратного PBS/1% BSA. Интенсивность флуоресценции измеряли посредством проточной цитометрии (BD Canto II) и анализировали с помощью FlowJo. Интенсивность флуоресценции преобразовывали в связанные молекулы/клетку с использованием частиц для количественного анализа (наборы Quantum™ MESF, Bangs Laboratories). K_D вычисляли с помощью GraphPad Prism 5.

Двойное связывание на клетках-мишенях.

Способность биспецифических антител служить "мостиком" между CD3⁺ Т-клетками и CD19⁺ В-клетками тестировали посредством FACS. Клетки Jurkat и клетки Raji предварительно раздельно метили 20 нМ CellTrace Far Red (Invitrogen-C34564) и 50 нМ кальцеина-AM (Invitrogen-C3099) при 37°C в течение 30 мин при плотности 1×10^6 клеток/мл. Осадки предварительно меченых клеток два раза промывали PBS/1% BSA, затем смешивали в соотношении 1:1 при конечной плотности 1×10^6 клеток/мл. Смесь клеток центрифугировали и ресуспендировали с 10 нМ антитела, а затем инкубировали в течение 1 ч. Смесь клеток анализировали посредством проточной цитометрии непосредственно после инкубации. Процент образования "мостика" вычисляли как процент одновременного мечения Far-Red и кальцеином.

Анализ цитотоксичности.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из гепаринизированной венозной крови посредством центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare-17-1440-03). Затем полученные PBMC пропускали через колонки EasySep (Stemcell-19053) для обогащения CD8⁺ Т-клеток, используемых в качестве эффекторных клеток. Эффективность антител в опосредовании лизиса опухолевых клеток CD8⁺ Т-клетками определяли посредством проточной цитометрии. В анализе цитотоксичности CD19⁺ В-клетки Raji в качестве клеток-мишеней предварительно метили 20 нМ CellTrace Far Red (Invitrogen-C34564) при 37°C в течение 30 мин, а затем клеточные осадки два раза промывали несодержащей фенол RPMI 1640 (Invitrogen-11835030), дополненной 1% FBS. Окрашенные Far Red клетки Raji (20000 клеток на лунку) инкубировали в 96-луночном круглодонном планшете (Corning-3799) с выделенными CD8⁺ Т-клетками (соотношение эффекторные клетки/клетки-мишени 5:1) и серийно разведенными антителами при 37°C в течение 4 ч. После инкубации тщательно примешивали 3 мкМ йодида пропидия (PL Invitrogen-P3566) для идентификации погибших клеток. Через 15 мин клетки анализировали посредством проточной цитометрии с использованием цитометра FACSCanto II. Аб-опосредованную цитотоксичность можно определять как процент PI-положительных клеток-мишеней среди Far Red-положительных клеток-мишеней. EC₅₀ в анализе цитотоксичности определяли с использованием GraphPad Prism.

Анализ активации Т-клеток.

Секретируемые цитокины ФНО α и ИФН γ .

Активацию Т-клетки отражает количество ФНО α и ИФН γ , секретируемых в супернатант. Способ выделения CD4- и CD8-положительных Т-клеток описан в разделе "Активация Т-клеток (окрашивание внутриклеточных цитокинов ФНО α и ИФН γ)". Смесь В-клеток человека Raji (2×10^4 клеток/лунку), CD4 $^+$ или CD8 $^+$ Т-клеток (1×10^5 клеток/лунку) и антител инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Собирали супернатант, затем центрифугировали реакционную смесь при 1500 об/мин в течение 5 мин. Количество ФНО α и ИФН γ в супернатанте определяли с помощью набора для ELISA ФНО человека (R&D-DY210) и набора для ELISA ИФН γ человека (захватывающее Ab: Thermo Fisher-M700A, детекторное Ab: Thermo Fisher-M701B, вещество-стандарт: PEROTECH-300-02), соответственно.

Способ ELISA сэндвич-формата представлял собой следующее. 96-луночные белок-связывающие планшеты для ELISA (ThermoFisher-442404) покрывали 50 мкл/лунку захватывающего антитела в карбонат-бикарбонатном буфере (20 мМ Na $_2$ CO $_3$, 180 мМ NaHCO $_3$, pH 9,2) по инструкциям производителя в течение ночи при 4°C или комнатной температуре. Все лунки три раза промывали 300 мкл PBS/0,5% Tween-20 (об./об.) на лунку и все последующие стадии промывки в ходе анализа осуществляли тем же образом. Затем лунки блокировали в течение одного часа с использованием PBS/2% BSA (BovoGen Biologicals-BSAS) в случае ФНО α и 100% казеина (Pierce-37528) в случае ИФН γ , затем промывали три раза с последующим связыванием собранного супернатант, описанного выше, или вещества-стандарта (50 мкл/лунку) в течение 1 ч при комнатной температуре и тремя промывками. Что касается связывания детекторного антитела, соответствующие антитела, разведенные в PBS/2% BSA в случае ФНО α и 50% казеине в случае ИФН γ , добавляли в соответствующие лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение двух часов. Планшеты промывали три раза перед добавлением 50 мкл HRP-конъюгированного вторичного антитела SA. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа, а затем промывали шесть раз, как описано выше. Для детекции связывания во все лунки добавляли 50 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) (Sigma-860336) на 10 мин перед остановкой реакции с помощью 50 мкл 2 М HCl. Количество ФНО α и ИФН γ определяли посредством измерения поглощения OD450 с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов SpectraMax $^{\text{®}}$ M5e.

Анализ активации Т-клеток - экспрессия поверхностных маркеров CD25 и CD69.

Активацию Т-клеток отражают сигналы окрашивания на поверхностные рецепторы CD25 и CD69. Способ выделения CD4- и CD8-положительных Т-клеток описан в разделе "Активация Т-клеток (окрашивание внутриклеточных цитокинов ФНО α и ИФН γ)". Смесь В-клеток человека Raji (2×10^4 клеток/лунку), CD4 $^+$ или CD8 $^+$ Т-клеток (1×10^5 клеток/лунку) и антитела инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После однократной промывки 1% BSA клеточные осадки ресуспендировали с буфером для окрашивания, содержащим FITC-конъюгированное антитело мыши против CD4 человека (BD-550628) или PerCpCy5.5-конъюгированное антитело мыши против CD8 человека (BD-560662), PE-конъюгированное антитело мыши против CD69 человека (BD-560968) и APC-конъюгированное антитело мыши против CD25 человека (BD-555434), с последующей инкубацией в течение 30 мин при 4°C. После двукратной промывки клеток процент PE- и APC-положительных клеток среди FITC- или PerCpCy5.5-положительных клеток определяли посредством проточной цитометрии.

Термостабильность (DSF).

Температуру плавления (T_m) антител исследовали с использованием системы для ПЦР в реальном времени QuantStudio $^{\text{TM}}$ 7 Flex (Applied Biosystems). 19 мкл раствора антитела смешивали с 1 мкл 62,5-кратного раствора SYPRO Orange (Invitrogen) и переносили в 96-луночный планшет (Biosystems). Планшет нагревали с 26°C до 95°C со скоростью 0,9°C/мин и собирали получаемые данные о флуоресценции. Вычисляли отрицательные производные изменений флуоресценции в отношении разных температур и определяли максимальное значение как температуру плавления T_m . Если белок имеет множество конформационных переходов с разворачиванием, регистрировали первые две T_m , обозначаемые как T_{m1} и T_{m2} . Сбор данных и вычисление T_m осуществляли автоматически с помощью программного обеспечения.

Стабильность в сыворотке.

Кровь человека получали из выбранных доноров и собирали в полистироловые пробирки без антикоагулянта. После отстаивания в течение 30 мин при комнатной температуре кровь человека центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин для сбора слоя сыворотки. Стадию центрифугирования повторяли до достижения прозрачности сыворотки. Антитела смешивали с собранной сывороткой в соотношении 1:9, и отбирали аликвоты при 37°C в указанные моменты времени: 0 дней, 1 день, 4 дня, 7 дней и 14 дней. Образцы быстро замораживали в разные моменты времени в жидком азоте и хранили при -80°C до использования. Образцы анализировали посредством FACS для оценки связывающей способности в отношении CD3 $^+$ Т-клеток Jurkat и CD19 $^+$ В-клеток Ramos посредством сравнения со связывающей способностью соответствующих антител без обработки сывороткой.

Аффинность связывания с рецептором Fcγ по результатам SPR.

Аффинность связывания антитела с FcγR определяли с использованием Biacore T200 (или Biacore 8K). Каждый рецептор захватывали с помощью антитела против His, иммобилизованного на сенсорном чипе CM5 (GE). Антитела в разных концентрациях впрыскивали на сенсорный чип при скорости потока 30 мкл/мин в фазу ассоциации в течение 60 с с последующей диссоциацией в течение 60 с. Затем чип регенерировали с помощью 10 мМ глицина (pH 1,5) после каждого цикла связывания.

Из тестовых сенсограмм вычитали сенсограммы контрольной поверхности и канала буфера. Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью модели 1:1 с использованием анализа по Ленгмюру (в случае FcγRI) или равновесной модели (в случае других рецепторов). Молекулярную массу 150 кДа использовали для вычисления молярной концентрации антител.

Связывание C1q по результатам ELISA.

Планшеты для ELISA (Nunc) покрывали образцами антител в количестве 3 мкг/мл в течение ночи при 4°C. После блокирования и промывки C1q серийно разводили, начиная с 600 мкг/мл, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем планшеты промывали и инкубировали с HRP-конъюгированным Ab овцы против C1q человека в течение 1 ч. После промывки добавляли субстрат ТМВ и взаимодействие останавливали с помощью 2 М HCl. Поглощение при 450 нм определяли с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов (Molecular Device).

Аффинность связывания с FcRn по результатам SPR.

Антитело аффинности связывания с FcRn определяли с использованием Biacore T200 (или Biacore 8K). Каждое антитело иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (GE). FcRn в разных концентрациях в подвижном буфере (50 мМ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 150 мМ NaCl, 0,05% Tween20, pH 6,0) впрыскивали на сенсорный чип при скорости потока 30 мкл/мин в фазу ассоциации в течение 60 с с последующей диссоциацией в течение 60 с. Затем чип регенерировали с помощью 1-кратного PBS (pH 7,4) после каждого цикла связывания.

Из тестовых сенсограмм вычитали сенсограммы контрольной поверхности и канала буфера. Экспериментальные данные аппроксимировали с помощью равновесной модели. Молекулярную массу 45 кДа использовали для вычисления молярной концентрации FcRn.

Исследование эффективности в модели Raji/PBMC мыши.

Опухолевые клетки Raji (ATCC® CCL-86™) поддерживали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде RPMI-1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки субкультивировали общепринятым образом дважды в неделю. Собирали клетки в фазе экспоненциального роста и подсчитывали для инокуляции опухоли.

PBMC человека выделяли из гепаринизированной цельной крови с использованием Ficoll-Paque Plus по инструкциям производителя.

Каждой мыши подкожно в правый бок совместно инокулировали опухолевые клетки Raji, смешанные с Matrigel, и свежие PBMC в 0,2 мл PBS в день 0. Антитела инъецировали со дня 3 (*i.v.* BIW × 4 раза).

Тестируемые препараты

Соединения	Упаков ка	Препарат	Концентрация мг/мл
Изотипический контроль	9,38 мг/мл	0,031 мл раствора+1,908 мл PBS	1,5
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP	2,6 мг/мл	В: 0,138 мл раствора+2,254 мл PBS	1,5
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP		В1: 0,450 мл В+1,800 мл PBS	0,3
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP		В2: 0,450 мл В1+1,800 мл PBS	0,06

Измерения опухоли и конечные точки.

Основной конечной точкой являлась проверка того, можно ли замедлить рост опухоли или можно ли вылечить мышей. Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух измерениях с использованием калипера и выражали объем в мм по формуле: $V=0,5a \times b^2$, где а и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Значение Т/С (в процентах) является показателем противоопухолевой эффективности.

TGI для каждой группы вычисляли по формуле: $TGI(\%)=[1-(T_i-T_0)/(V_i-V_0)] \times 100$; T_i представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в указанный день, T₀ представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в день начала лечения, V_i представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе, которой вводили носитель, в тот же день, что и T_i, и V₀ представляет собой средний объем опухоли в группе, которой вводили носитель, в день начала лечения.

ПК, токсичность и иммуногенность у яванского макака.

Одному самцу и одной самке яванского макака вводили WBP3438 в количестве 1 мг/кг однократно посредством внутривенного болюсного введения. Составы составляли в 20 мМ NaAc-HAc, 7,0% (мас./мас.) сахарозы, 0,02% (мас./об.) PS80, pH 5,0. Образцы крови для анализа ПК собирали перед введением дозы (день -1), через 0,25 ч, 0,5 ч, 1 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч, в день 3, день 7, день 14, день 21 и день 28. Образцы для анализа антитела против лекарственного средства (ADA) собирали через 3 дня, 14 дней (312 ч) и 28 дней (480 ч).

Концентрации WBP3438 и ADA в образцах сыворотки определяли посредством ELISA. Концентрацию WBP3438 в сыворотке обезьян подвергали некомпартментному фармакокинетическому анализу с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin (версии 6.3, Pharsight, Mountain View, CA). При получении параметров ПК использовали линейное/логарифмическое правило трапеций.

Осуществляли наблюдения у клетки в отношении общего здоровья и внешнего вида, в особенности, раздражения кожи. Анализ образцов цельной крови на гематологические параметры (CBC) и биохимический анализ сыворотки осуществляли с помощью гематологического анализатора (ADVIA2120) и химического анализатора (HITACHI 7180), соответственно.

Результаты.

Получение линии клеток, экспрессирующей CD19 яванского макака.

Экспрессию в линии клеток, экспрессирующей CD19 яванского макака, WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9 определяли с использованием антитела против CD19 посредством проточной цитометрии. WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9 демонстрировала высокую экспрессию CD19 яванского макака (фиг. 37).

Получение и оптимизация WuXiBody.

На фиг. 1 показана схема исследуемых антител и форматов. Разрабатывали антитело против CD3 T3 и антитело против CD19 U4. Константную область (CL и CH1) T3 заменяли константным доменом TCR для конструирования уникальной области контакта легких и тяжелых цепей, являющейся ортогональной относительно обычного антитела. TCR-модифицированное T3 и нативное U4 в комбинации с мутациями "выступы-во-впадины" в домене Fc использовали для конструирования формата биспецифического антитела E17 и F16.

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи связывающих функциональных фрагментов против CD3 и против CD19 из W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP и W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP приведены ниже.

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP и W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP	VH антитела против CD3	Последовательность ДНК (SEQ ID NO: 353)	CAGGTGCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCA GAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTAGTGTC AAGGTGTCATGCAAGGCTAGCGGGTTC GCCTTACTGACTACTACATCCACTGGG TGCGGCAGGCTCCCGGACAAGGGTTGG AGTGGATGGGATGGATCTCCCCAGGCAA TGTC AACACAAAGTACAACGAGAACTT CAAAGGCCGCGTCAACATTACCGCCGA CAAGAGCACCTCCACAGCTACATGGA GCTGTCCAGCCTCAGAAGCGAGGACAC TGCCGTCTACTACTGTGCCAGGGATGGG TACTCCCTGTATTACTTTGATTACTGGGG CCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTC C
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID)	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFE</u> <u>FTDYIHWVRQAPGQGLEWMGWISPGN</u> <u>VNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMEL</u> <u>SSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGQ</u>

		NO: 352)	GTLVTVSS
VL антитела против CD3	Последовательность ДНК (SEQ ID NO: 355)		GATATCGTGATGACCCAGAGCCAGACT CCCTTGCTGTCTCCCTCGGGAAAGAG CAACCATCAACTGCAAGAGCTCCAAA GCCTGCTGAACTCCAGGACCAGGAAGA ATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATCTAC TGGGCCTCCACCCGGCAGTCTGGGGTG CCCGATCGGTTTAGTGATCTGGGAGCG GGACAGACTTCACATTGACAATTAGCTC ACTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTCTA CTACTGTACTCAGAGCCACACTCTCCGC ACATTCGGCGGAGGGACTAAAGTGGAG ATTAAG
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 354)	<u>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL</u> <u>LNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW</u> <u>STRQSGVPDRFSGSGSDFTLTISSLQAE</u> DVAVYYCTQSHLLRIFGGGKVEIK
VH антитела против CD19	Последовательность ДНК (SEQ ID NO: 368)		CAAATGCAGCTCGTCCAGTCTGGACCT GAAGTGAAGAAGCCCGGACATCCGTC AAGGTCTCATGTAAGGCTAGCGGTAC GCATTCACTTCTACAACATGTAAGTGGG TGGCCAGGCCAGAGGACAGAGGTTGG AGTGGATCGGCTACATCGACCCATACAA CGCCGATACTACCTACAATCAGAAGTTT AAAGGGCGGGTGACCATACCCGGGAT ATGTCCACCTCCACCGCTACATGGAGC TGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACA GCCGTGTAATACTGCCTGACAACAGCCT ATGCCATGACTATTGGGGCCAGGGCAC ACTTGTGACTGTGAGCAGT
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 367)	QMLVQSGPEVKKPGTSVKVSKASGYA FTSYNMYWVRQARGQRLEWIGYIDPYN ADTTYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMEL
		ность (SEQ ID NO: 367)	SSLRSEDVAVYYCLTAYAMDYWGQGLT VTVSS
VL антитела против CD19	Последовательность ДНК (SEQ ID NO: 370)		GACATCCAGCTCACCCAATCCCCTTCTT TCCTCTCCGCAAGTGTCCGAGATAGGGT GACTATCACCTGCTCAGCTTCTCAACC GTGAATACTATGCATTGGTACCAGCAGA AGCCCGGAAAGCCCCAAAGCTGCTGA TCTACAGCACCTCAATCTGGCCAGTGG AGTGCCAAGCCGGTTTAGCGGGAGCGG CTCCGGCACTGAATTCATTGACAATT AGCAGCCTCAGCCTGAGGACTTGGC ACATATACTGTACCAAGTGGTCCAGCT ACCCCTACACATTCGGGCAGGGCACAA AGCTGGAGATTAAG
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 369)	<u>DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVN</u> <u>YMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVP</u> SRFSGSGSTEFTLTISLQPEDFATYYCH <u>QWSSYPYTFGQGTKLEIK</u>

Последовательности полноразмерных W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP и W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP приведены ниже.

Антитело	Цепь	Последовательности
W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP	T3-LC (SEQ ID NO: 12)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAW YQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFLTIS SLQAEDVAVYYCTQSHTLRFTGGGKVEIKPDIQNPDAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSP ESS
	T3-HC (SEQ ID NO: 25)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVWRQ APGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGGTLVTV LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSR LRVSATFWQNP RNHFRCVQYFGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRYPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM
		ISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
	U4-LC (SEQ ID NO: 23)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVNYMHWYQKPG KAPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCHQWSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
	U4-HC (SEQ ID NO: 26)	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYAFTSYNMYWVR QARGQRLEWIGYIDPYNGDTTYNQKFKGRVTITRDMSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCLTAYAMDYWGQTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTKNQ VLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSLGK
Антитело	Цепь	Последовательности
W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP	T3-LC (SEQ ID NO: 12)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSRTRKNYLAW YQKPGQPPKLLIYWASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFLTIS SLQAEDVAVYYCTQSHTLRFTGGGKVEIKPDIQNPDAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDVYITDKCVL DMRSMDFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTFFPSP ESS
	T3-HC (SEQ ID NO: 25)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFAFTDYYIHVWRQ APGQGLEWMGWISPGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWGGTLVTV LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSR

	LRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV QIVSAEAWGRYPGPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
U4-LC (SEQ ID NO: 23)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSTVNYMHWYQQKPG KAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCHQWSSYPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
U4-HC (SEQ ID NO: 27)	QMQLVQSGPEVKKPGTTSVKVSCASGYAFTSYNMYWVR QARGQRLEWIGYIDPYNGDITYNQKFKGRVTITRDMSTST AYMELSSLRSEDYAVYYCLTAYAMDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTC NVDHKPSNTKVDKRVGGGGGGGQMQLVQSGPEVKK PGTSVKVSCASGYAFTSYNMYWVRQARGQRLEWIGYID PYNGDITYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCLTAYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDK VESKYGPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSRLLVDKSRW QEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Получение W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP.

Титр экспрессирующегося антитела W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP составляет более 90 мг/л при транзиторной экспрессии. После двухстадийной очистки чистота W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP достигает 97,5% (SEC-ВЭЖХ, фиг. 39). W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP мигрирует с кажущейся молекулярной массой 75 кДа, 55кДа и 25 кДа при электрофорезе в ПААГ в присутствии SDS в восстановительных условиях, что соответствует двум тяжелым цепям и двум легким цепям. Две легкие цепи могут перекрываться из-за схожих молекулярных масс. Антитело мигрирует с кажущейся молекулярной массой 200 кДа в невосстановительных условиях, что соответствует интактной биспецифической молекуле (фиг. 38).

Получение W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP.

Титр экспрессирующегося антитела W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP составляет более 100 мг/л при транзиторной экспрессии. После двухстадийной очистки чистота W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP достигает 95% (SEC-ВЭЖХ, фиг. 41). W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP мигрирует с кажущейся молекулярной массой 54 кДа, 56 кДа и 25 кДа при электрофорезе в ПААГ в присутствии SDS в восстановительных условиях, что соответствует двум тяжелым цепям и двум легким цепям. Две легкие цепи могут перекрываться из-за схожих молекулярных масс. Антитело мигрирует с кажущейся молекулярной массой 150 кДа в невосстановительных условиях, что соответствует интактной биспецифической молекуле (фиг. 40).

Связывание мишени.

Связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с CD19 и CD3 тестировали на клетках Ramos и Jurkat посредством проточной цитометрии (фиг. 42А-42В). Антитело W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP демонстрировало высокую активность связывания с Ramos и Jurkat клетки со значениями EC₅₀ 15,6 нМ и 47 нМ, соответственно.

Связывание W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP с CD19 и CD3 тестировали на клетках Ramos и Jurkat посредством проточной цитометрии (фиг. 43А-43В). Антитело W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP демонстрировало высокую активность связывания с клетками Ramos и Jurkat со значениями EC₅₀ 1,8 нМ и 19,3 нМ, соответственно.

Межвидовое связывание.

Связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с CD19 яванского макака тестировали на клетках WBP701.CHO-K1.pro1.FL.C9 (CD19-экспрессирующих клетках) посредством проточной цитометрии (фиг. 44). EC₅₀ связывания составляла 26 нМ. Связывание W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с CD3 яванского

макака тестировали с использованием W331-супоPro1.ECD.His (белка эpsilon-цепи CD3 яванского макака) посредством ELISA (фиг. 45). EC_{50} связывания составляла 0,04 нМ.

Аффинность к клеткам-мишеням.

Аффинность связывания W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с CD19 и CD3 человека тестировали на клетках Ramos и Jurkat посредством проточной цитометрии. Графики связанного IgG/свободного IgG относительно связанного IgG показаны 46А и 46В. Аппроксимированные значения K_D связывания с CD19 и CD3 составляли 23 нМ и 9,0 нМ, соответственно.

Двойное связывание на клетках-мишенях.

Активность W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP в качестве "мостика" между CD3⁺ Т-клетками и CD19⁺ В-клетками тестировали с использованием предварительно меченых клеток Jurkat и Raji посредством проточной цитометрии (фиг. 47А-47В). Q2 соответствует популяции соединенных "мостиком" клеток Jurkat и Raji. По сравнению с отрицательным контролем, приблизительно 18% клеток были соединены "мостиком" посредством биспецифического антитела W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP.

Анализ цитотоксичности.

Цитотоксическую активность W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP оценивали с использованием CD8⁺ Т-клеток и клеток Raji. W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP индуцировало быстрый и эффективный лизис клеток после инкубации в течение 4 ч (фиг. 48А) со значением EC_{50} 15 нМ. Максимальный процент лизиса клеток составлял 90%.

Цитотоксическую активность W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP оценивали с использованием CD8⁺ Т-клеток и клеток Raji. W3438-T3U4.F16-1.uIgG4.SP индуцировало быстрый и эффективный лизис клеток после инкубации в течение 4 ч (фиг. 48В) со значением EC_{50} 3,2 нМ. Максимальный процент лизиса клеток составлял 90%.

Мишене-специфическая активация Т-клеток.

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP исследовали с помощью анализов, в которых активацию Т-клеток определяли с помощью маркеров активации CD69 и CD25 в присутствии или отсутствие CD19⁺ клетками-мишеней. Результаты свидетельствуют о том, что W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP индуцирует экспрессию маркеров активации Т-клеток CD25 и CD69 дозозависимым образом только в присутствии CD19⁺ клетками-мишеней (фиг. 49А-49D). В отсутствие В-клеток не наблюдали экспрессию CD25 и CD69 в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP также исследовали с помощью анализов активации Т-клеток в отношении высвобождения цитокинов в присутствии или отсутствие CD19⁺ клетками-мишеней. Результаты свидетельствуют о том, что W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP индуцирует высвобождение ИФН γ и ФНО α дозозависимым образом только в присутствии CD19⁺ клетками-мишеней (фиг. 50А-50D). В отсутствие В-клеток не определяли ИФН γ и ФНО α в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Термостабильность.

Термостабильность W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP исследовали с использованием ПЦР в реальном времени. T_m1 и T_m2 W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP составляют 60,2°C и 72,7°C.

Стабильность в сыворотке.

W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP инкубировали в сыворотке при 37°C в течение 14 дней. Связывающую активность антитела, инкубируемого в течение 0, 1, 4, 7 и 14 дней, определяли посредством проточной цитометрии. Результаты свидетельствуют о том, что активность связывания W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с CD3⁺ и CD19⁺ клетками была неизменной после инкубации в сыворотке человека в течение 14 дней (фиг. 51А-51В).

Связывание рецептора Fc γ .

Активность связывания W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP с Fc γ RI, Fc γ RIIa (H167), Fc γ RIIa (R167), Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa (F176), Fc γ RIIIa (V176) и Fc γ RIIIb исследовали посредством SPR. Аффинности приведены в табл. 39. W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP демонстрировало типичную аффинность связывания IgG4 человека со всеми рецепторами Fc γ .

Таблица 39

Аффинность W3438-T3U4.E17-1.uIgG4.SP
к Fc-рецептору по результатам SPR

Fc-рецептор	K_D (M)
Fc γ RI	9,79E-09
Fc γ RIIa (H167)	2,05E-05
Fc γ RIIa (R167)	1,58E-05
Fc γ RIIb	2,41E-05
Fc γ RIIIa (F176)	2,93E-05
Fc γ RIIIa (V176)	1,40E-05
Fc γ RIIIb	>4,10E-05

Активность связывания антитела с C1Q тестировали посредством ELISA. W3438-T3U4.E17-

1. uIgG4.SP не демонстрировало связывание в ELISA (фиг. 52), а контрольное антитело IgG1 человека демонстрировало нормальный сигнал связывания.

Связывание FcRn.

Связывание W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP с FcRn тестировали посредством SPR при pH 6,0. Аффинность аппроксимировали как 2,58 мкМ, что является типичной аффинностью IgG4 человека к FcRn.

Исследование эффективности в модели ксенотрансплантата PBMC/Raji.

В этом исследовании определяли противоопухолевую эффективность of W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP в гуманизированной модели смешанных PBMC с клетками Raji на мышах NOG. Кривая роста опухоли показана на фиг. 53.

В день 14 средний размер опухоли в группе лечения, которой вводили изотипический контроль, достигал 342 мм³. Введение 1,5 мг/кг и 0,5 мг/кг W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP приводило к значительной противоопухолевой активности. Средний размер опухоли составлял 78 мм³ (T/C=23,0%, TGI=93,9%, p=0,016) и 75 мм³ (T/C=22,0%, TGI=95,3%, p=0,014), соответственно, и опухоль у одного животного в группе с высоким уровнем дозы подвергалась эрадикации. W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP в очень низкой дозе (0,06 мг/кг) не демонстрировало какую-либо противоопухолевую активность.

Фармакокинетика WuXiBody у яванского макака.

Концентрацию W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP в сыворотке яванского макака тестировали посредством ELISA (фиг. 54). Вычисленные параметры PK приведены в табл. 40. Время полужизни W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP в случае однократной инъекции IV в дозе 1 мг/кг составляло 152 ч. W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP демонстрировало гораздо большее время полужизни, чем блинатумомаб, имеющий очень небольшое время полужизни (1,5-2,6 ч) у шимпанзе (экспертный отчет Европейского агентства лекарственных средств ЕМА/CHMP/469312/2015).

Таблица 40

PK W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP у яванского макака

Параметр PK	W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP
C ₀ (мкг/мл)	60,4
T _{1/2} (ч.)	152
V _{dss} (л/кг)	0,0513
Cl (мл/мин/кг)	0,00462
AUC _{0-last} (ч.*мкг/мл)	3552
AUC _{0-inf} (ч.*мкг/мл)	3708
MRT _{0-last} (ч.)	157
MRT _{0-inf} (ч.)	187

Токсичность.

Все обезьяны хорошо переносили лекарственное средство в течение всего исследования. Не наблюдали неблагоприятные эффекты во время прижизненной фазы исследования. Не наблюдали очевидных изменений в потреблении пищи и массе тела. Параметры общего и биохимического анализов крови, включая АСТ, АЛТ, лейкоциты, гемоглобин и гематокрит, как правило, находились в пределах референсного диапазона.

Иммуногенность.

Результаты тестирования иммуногенности W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP показаны на фиг. 55A-55B. Титры антитела против лекарственного средства (ADA) против W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP в сыворотке обезьян через 3, 14 и 28 дней после введения дозы не имели значимых различий по сравнению с уровнем перед введением дозы. Таким образом, по-видимому, однократная инъекция IV W3438-T3U4.E17-1. uIgG4.SP в дозе 1 мг/кг не являлась иммуногенной для обезьян.

Пример 18. Биспецифическое WuXiBody против CTLA-4×PD-1.

Предпосылки.

Иммунотерапия является актуальной темой исследований лечения злокачественных новообразований. Антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4) является одной из валидированных мишеней иммунных контрольных точек. После активации Т-клеток CTLA-4 быстро экспрессируется на этих Т-клетках, как правило, в течение одного часа после связывания антигена с TCR. CTLA-4 может ингибировать передачу сигнала Т-клеток посредством конкуренции с CD28, опосредующим хорошо описанный костимуляторный сигнал Т-клеток. Связывание CD28 с его лигандами CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на антигенпрезентирующих клетках приводит к пролиферации Т-клеток посредством индуцирования продукции интерлейкина-2 и антиапоптотических факторов. Из-за гораздо более высокой аффинности связывания CTLA-4 с CD80 и CD86, чем CD28, CTLA-4 может конкурентно вытеснять CD28 в отношении связывания с CD80 и CD86, что приводит к супрессии активации Т-клеток. В дополнение к индуцируемой экспрессии на активированных Т-клетках, CTLA-4 конститутивно экспрессируется на поверхности регуляторных Т-клеток (Treg), что позволяет предполагать, что CTLA-4 может быть необходимым для контактно-опосредуемой супрессии и ассоциированным с продукцией Treg иммуносупрессорных цитоки-

нов, таких как трансформирующий фактор роста бета и интерлейкин-10.

Блокада CTLA-4 может индуцировать регрессирование опухоли, что показано в ряде доклинических и клинических исследований. Два антитела против CTLA-4 находятся на стадии клинической разработки. Ипилимумаб (MDX-010, BMS-734016), полностью человеческое моноклональное антитело против CTLA-4 изотипа IgG1-каппа, является иммуномодулирующим средством, одобренным в качестве монотерапии для лечения меланомы на поздней стадии. Предполагаемый механизм действия ипилимумаба представляет собой противодействие взаимодействию CTLA-4, экспрессирующегося на субпопуляции активированных Т-клеток, с молекулами CD80/CD86 на "профессиональных" антигенпрезентирующих клетках. Это приводит к потенцированию Т-клеток по причине блокады ингибиторной модуляции активации Т-клеток, стимулируемой взаимодействием CTLA-4 и CD80/CD86. Возникающая активация Т-клеток, пролиферация и лимфоцитарная инфильтрация опухолей приводят к гибели опухолевых клеток. Коммерческая лекарственная форма представляет собой 5 мг/мл концентрата раствора для инфузии. Ипилимумаб также находится на стадии клинических исследований для других типов опухолей, включая рак предстательной железы и рак легких. Второе антитело против CTLA-4, находящееся на стадии клинической разработки, тремелиумаб, исследовали в качестве монотерапии меланомы и злокачественной мезотелиомы.

Белок программируемой гибели-1 (PD-1, CD279) является членом семейства CD28, экспрессирующимся на активированных Т-клетках и других иммунных клетках. Связывание PD-1 ингибирует функционирование этих иммунных клеток. PD-1 имеет два известных лиганда, PD-L1 (B7-H1, CD274) и PD-L2 (B7-DC, CD273), оба из которых принадлежат к семейству B7. Экспрессия PD-L1 является индуцибельной в различных типах клеток лимфоидных и периферических тканей, в то время PD-L2 больше ограничен миелоидными клетками, включая дендритные клетки. Основной ролью пути PD-1 является снижение воспалительного иммунного ответа в тканях и органах.

Иммунотерапия с использованием комбинации моноклональных антител (mAb), блокирующих CTLA-4 (ипилимумаба) и PD-1 (ниволумаба), продемонстрировала клиническую пользу, превосходящую таковую при использовании любого из mAb в отдельности. Биспецифическое WuXiBody против CTLA-4×PD-1 разрабатывали для индуцирования противоопухолевого иммунитета посредством одновременной блокады обеих молекулы иммунных контрольных точек.

Материалы и способы.

Общие материалы.

Общие исследовательские материалы и их источники приведены в таблице ниже.

Материалы	Поставщик	Кат. №
Клетки Expi293F™	Thermo Fisher	Кат. № A14527
Набор для трансфекции ExpiFectamine293	Thermo Fisher	Кат. № A14524
Среда для экспрессии Expi293F™	Thermo Fisher	Кат. № A1435101
Реагент для трансфекции Lipofectamine™ 2000	Thermo Fisher	Кат. № 11668019
Клетки FreeStyle™ 293-F	Thermo Fisher	Кат. № R79007
Среда для экспрессии FreeStyle™ 293	Thermo Fisher	Кат. № 12338002
Клетки CHO-S	Thermo Fisher	Кат. № A1155701
Среда для экспрессии FreeStyle™ CHO	GIBCO	Кат. № 12651014
Эмбриональная телячья сыворотка (FBS)	Corning	Кат. № 35-076-CV
Opti-MEM	Thermo Fisher	Кат. № 31985070
Колонка с Ni-сефарозой	GE healthcare	Кат. № 17-5247-01
Колонка с протеином А	GE healthcare	Кат. № 17-5438-02
Superdex200 препаративной категории	GE Healthcare	Кат. № 17-1043-01
ВЭЖХ-SEC	TOSOH	Кат. № 0008541
Бис-Трис гель NuPAGE4%-12%	Thermo Fisher	Кат. № NP0322BOX
CTLA-4 человека: W316-hPro1.ECD.His	Sino Biological	Кат. № 11159-H08H
CTLA-4 яванского макака: W316-cpro1.ECD.his	Sino Biological	Кат. № 90213-C08H
PD-1 человека: W305-hPro1.ECD.His	Собственное производство	
PD-1 яванского макака: W305-cуноPro1.ECD.His	R&D	Кат. №R&D-8509-PD-050
Покрытые 96-луночные планшеты для ELISA	Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher	
96-луночные планшеты с U-образным дном для FACS	Corning-COSTAR	3799
Положительная по PD-1 человека линия клеток: W305-CHO-S.hPro1.C6	Собственное производство	
Положительные по PD-1 яванского макака	Собственное	

клетки: W305-293F.cPro1.FL.Pool	производство	
Положительная по CTLA-4 человека линия клеток: W316-293F.hPro1.FL	Собственное производство	
Положительная по CTLA-4 яванского макака линия клеток W316-293F.cPro1.FL.Pool	Собственное производство	
Положительная по CD80 человека линия клеток: W316-CHO-K1.hPro1L1.B9B11	Собственное производство	
Положительная по CD86 человека линия клеток W316-CHO-K1.hPro1L2.A4A7	Собственное производство	
PD-1 человека: W305-hPro1.ECD.mFc	Собственное производство	
PD-1 человека: W305-hPro1.ECD.hFc	Собственное производство	
PD-1 человека: W305-hPro1.ECD.His	Собственное производство	
PD-1 яванского макака: W305-cPro1.ECD.His	Собственное производство	
Белок СуноPD-1.hFc	SinoBiological	90311C02H
CTLA-4 человека: W316-hPro1.ECD.mFc	Собственное производство	
CTLA-4 человека: W316-hPro1.ECD.hFc	Собственное производство	
CTLA-4 человека: W316-hPro1.ECD.His	Собственное производство	
CTLA-4 яванского макака: W316-cPro1.ECD.His	Собственное производство	
PDL1 человека: W315-hPro1.ECD.mFc	Собственное производство	
СуноPD-L1.hFc-биотин	Собственное производство	
Меченое биотином W316.hPro1.ECD.hFc	Собственное производство	
CD80 человека: W316-hPro1L1.ECD.His	Собственное	

	производство	
WBP316-ВМК1 (ипилимуаб)	Собственное производство	
WBP305 ВМК1 (ниволумаб)	Собственное производство	
WBP324-ВМК1.IgG1.KDL	Собственное производство	
Изотипический контроль: WBP332-1.80.12.xAb.hIgG4	Собственное производство	
HRP-меченое антитело козы против Fc IgG человека	Bethyl Laboratories	A80-304P
HRP-меченое мышь против Fc IgG человека (CH2)	Thermo	MA5-16859
HRP-меченое антитело козы против мышь IgG Fc	Bethyl Laboratories	A90-231P
HRP-меченый стрептавидин	Life Technologies	SNN1004
Меченое биотином mAb против His	GenScript	A00613
FITC-меченое антитело козы против IgG человека	Jackson	109-095-008
PE-меченое антитело козы против IgG человека	Jackson	109-115-098
FITC-меченое антитело козы против IgG мыши	Abcam	98716
PE-меченый стрептавидин	BD	554061
Ficoll-Paque человека	Stemcell	07861
Набор для обогащения моноцитов	Miltenyi	Biotec-130-050-201
Набор для обогащения CD4 ⁺ Т-клеток	Stemcell	19052
Набор для обогащения CD4 ⁺ CD25 ⁺ Т-клеток	Miltenyi	130-093-631
Рекомбинантный ГМ-КСФ человека	R&D	215-GM
Рекомбинантный ИЛ-2 человека	SL PHARM	
Рекомбинантный ИЛ-4 человека; Ab против ИЛ-2	R&D	AG1815401; MAB602
Стандарт рекомбинантного ИФН γ человека	Peprotech	300-02
Антитела против ИФН γ	Life technology	M700A;M7001B
НЗ-тимидин и MicroScint	Perkin Elmer	NET027001MC
Эмбриональная телячья сыворотка (FBS)	GIBCO	10100147
Среда RPMI 1640	GIBCO	22400089
DPBS	Corning	21-031-CVR
Реагенты для анализа цитотоксичности DELFIA® EuTDA	PerkinElmer	AD0116
Набор для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo	Promega	G7573
Кальцеин-AM	Corning-354216	354216
Far red	Invitrogen	C34572

Получение растворимых антигенов.

Последовательности ДНК, кодирующие последовательность внеклеточного домена PD-1 человека (регистрационный номер Uniport Q15116), синтезировали в Sangon Biotech (Shanghai, China), а затем субклонировали в модифицированные экспрессирующие векторы pcDNA3.3 с меткой 6xHis на С-конце. Белки CTLA-4 человека, яванского макака и мыши и PD-1 мыши и яванского макака приобретали в Sino Biological.

Клетки Expi293 (Invitrogen-A14527) трансфицировали с использованием очищенного экспрессирующего вектора pcDNA3.3. Клетки культивировали в течение 5 дней и собирали супернатант для очистки белка с использованием колонки Ni-NTA (GE Healthcare, 175248). Полученный PD-1 человека подвергали контролю качества посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и SEC, а затем хранили при -80°C.

Получение референсных антител.

Последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область антитела против CTLA-4 (WBP316-ВМК1), антитела против PD-1 (WBP305-ВМК1) синтезировали в Sangon Biothec (Shanghai, China), а затем субклонировали в модифицированные экспрессирующие векторы pcDNA3.4 с константной областью IgG1 человека или IgG4 человека (S228P). Антитела против PD-1 WBP3055-1.153.7.uIgG4k и WBP3055-1,103,11.uIgG4k получали после иммунизации крыс PD-1 человека и PD-1 мыши и преобразовывали в формат IgG4 (S228P). Синтезировали последовательность ДНК, кодирующую демонстрационное биспецифическое антитело против CTLA-4×PD-1 (WBP324-ВМК1.IgG1.KDL).

С помощью плазмид, содержащих гены VH и VL, котрансфицировали клетки Expi293. Клетки культивировали в течение 5 дней и собирали супернатант для очистки белка с использованием колонки с протеином А (GE Healthcare, 175438) или колонки с протеином G (GE Healthcare, 170618). Полученные антитела тестировали посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и SEC, а затем хранили при -80°C.

Получение экспрессирующих мишень линий клеток.

С помощью Lipofectamine 2000 клетки CHO-S или 293F трансфицировали с использованием экспрессирующих векторов, содержащих гены, кодирующие полноразмерный PD-1 человека или PD-1 мыши. Клетки культивировали в среде, содержащей соответствующие селективные маркеры. Стабильную линию клеток с высокой экспрессией PD-1 человека (WBP305.CHO-S.hPro1.C6) и стабильную линию клеток с высокой экспрессией PD-1 мыши (WBP305.293F.mPro1.B4) получали способом предельных разведений.

Получение биспецифических антител против CTLA-4/PD-1.

Конструирование W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP: Последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против PD-1, константную область 1, вариабельную область тяжелой цепи антитела против CTLA-4, константную область бета-цепи TCR, и константную область 2 и 3 IgG4 (S228P), соединенные с 5'-конца к 3'-концу, клонировали в модифицированный экспрессирующий вектор pcDNA3.3. Последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против CTLA-4 на 5'-конце константной области альфа-цепи TCR, клонировали в другой модифицированный экспрессирующий вектор pcDNA3.3. Легкую цепь антитела против PD-1 клонировали в третий модифицированный экспрессирующий вектор pcDNA3.3.

Конструирование W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP: Последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела против PD-1, константную область бета-цепи TCR, вариабельную область тяжелой цепи антитела против CTLA-4 и константную область IgG4 (S228P), соединенные с 5'-конца к 3'-концу, клонировали в модифицированный экспрессирующий вектор pcDNA3.3. Последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область легкой цепи антитела против PD-1 на 5'-конце константной области альфа-цепи TCR, клонировали в другой модифицированный экспрессирующий вектор pcDNA3.3. Легкую цепь антитела против CTLA-4 клонировали в третий модифицированный экспрессирующий вектор pcDNA3.3.

Соответствующие последовательности W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP приведены ниже.

LC1	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 412)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGNKDVHWYQ QKPGQAPVLYIRDSNRPSGPIEGFSGNSGNTATLTI SRAQAGDEADYYCQVWDSIWVFGGGTKLTVLGQP KAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
LC2	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 413)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWY QKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGGSPWTFGGGTKVEIKPDI

		QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSQKSDFAC ANAFQNSIIPEDTFFPSPESS
HC	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 414)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW VRQAPGKGLEWVSTITGGGSIYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFD YWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YLSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV GGGSGGGGQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS GFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARTGWLGPFDYWGQTLVTVLEDLKKNVFPPEVAVF EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGK EVHSGVCTDPQLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATF WQNPRNHRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIV SAEAWGRYGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLG

Соответствующие последовательности W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP приведены ниже.

LC1	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 415)	SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGDNIGNKDVHWYQ QKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPEGFSGNSNGNTATLTIS RAQAGDEADYYCQVWDSIWVFGGKTLTVLPDIQN PDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSD VYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSQKSDFACANAF QNSIIPEDTFFPSPESS
LC2	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 416)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSANSALSYMYWYQQ KPDQSPKLWVHGTSNLAGVPSRFSGSGTDFTLTI NSLEAEDAATYYCHHSNTQWTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ

		WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
HC	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 417)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSW VRQAPGKGLEWVSTITGGGSIYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRAGEGYFDY WGQGLTVTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQP LKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQNPVNHFRQV QFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRGGGGS GGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT NYFMNWVRQAPGQGLEWMGRVDPEQGRADYAEKF KKRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRAM DNYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLG

В случае обоих биспецифических антител с помощью одного экспрессирующего вектора для тяжелой цепи и двух экспрессирующих векторов для легкой цепи котрансфицировали клетки Expi293 (Thermo Fisher-A14527) по инструкциям производителя. Через пять дней после трансфекции собирали супернатанты и очищали их с использованием колонки с протеином А (GE Healthcare-17543802) и дальнейшей эксклюзионной хроматографии (GE Healthcare-17104301). Концентрацию антитела измеряли с помощью Nano Drop. Низкий уровень эндотоксина подтверждали с использованием набора для детекции эндотоксина (GenScript-L00350), и уровень эндотоксина для двух биспецифических антител составлял менее 10 МЕ/мг. Чистоту белков оценивали посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и ВЭЖХ-SEC.

Характеризация *in vitro*.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия (DSF).

Анализ DSF осуществляли с использованием системы для ПЦР в реальном времени 7500 Fast (Applied Biosystems). В кратком изложении, 19 мкл раствора биспецифического антитела смешивали с 1 мкл 62,5-кратного раствора SYPRO Orange (ThermoFisher-S6650) и добавляли в 96-луночный планшет. Планшет нагревали с 26°C до 95°C со скоростью 2°C/мин и собирали получаемые данные о флуоресценции. Данные анализировали автоматически с помощью операционного программного обеспечения и вычисляли T_h , используя максимальное значение отрицательной производной получаемых данных о флуоресценции относительно температуры. T_{on} можно приблизительно определять как температуру на графике отрицательной производной, начинающуюся снижаться относительно исходного уровня до перехода.

Связывание PD-1 человека по результатам FACS

Сконструированные экспрессирующие PD-1 человека клетки W305-CHO-S.hPro1.C6 высевали в количестве 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (COSTAR 3799). К клеткам добавляли титрованные в 3,16 раз антитела в 1% BSA/DPBS от 200 нМ до 0,002 нМ. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл разведенного 1:125 PE-меченого антитела козы против антитела человека (Jackson 109-115-098) и инкубировали планшеты при 4°C в течение 1 ч. Связывание антител на клетках тестировали посредством проточной цитометрии и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью FlowJo.

Связывание PD-1 яванского макака по результатам FACS.

Сконструированные экспрессирующие PD-1 яванского макака клетки W305-293F.cynoPro1.FL.pool высевали в количестве 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (COSTAR 3799). К клеткам добавляли титрованные в 4,0 раз Ab в 1% BSA/DPBS от 40 мкг/мл до 0,0001526 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл разведенного 1:150 PE-меченого антитела козы против антитела человека (Jackson 109-115-098) и инкубировали планшеты при 4°C в течение 1 ч. Связывание антител на клетках тестировали посредством проточной цитометрии и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью FlowJo.

Связывание CTLA-4 человека по результатам FACS.

Сконструированные экспрессирующие CTLA-4 человек клетки W316-293F.hPro1.FL высевали в количестве 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (COSTAR 3799). К клеткам добавляли титрованные в 3,16 раз Ab в 1% BSA/DPBS от 200 нМ до 0,002 нМ. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл разведенного 1:150 PE-меченого антитела козы против антитела человека (Jackson 109-115-098) и инкубировали планшеты при 4°C в течение 1 ч. Связывание антител на клетках тестировали посредством проточной цитометрии и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью FlowJo.

Связывание CTLA-4 яванского макака по результатам FACS.

Сконструированные экспрессирующие CTLA-4 человека клетки W316-293F.cynoPro1.F1.pool высевали в количестве 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (COSTAR 3799). К клеткам добавляли титрованные в 4 раза Ab в 1% BSA/DPBS от 40 мкг/мл до 0,00004 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки в каждую лунку добавляли 100 мкл разведенного 1:150 PE-меченого антитела козы против антитела человека (Jackson 109-115-098) и инкубировали планшеты при 4°C в течение 1 ч. Связывание антител на клетках тестировали посредством проточной цитометрии и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью FlowJo.

Двойное связывание hPD-1 и hCTLA-4 по результатам ELISA Для тестирования того, могут ли биспецифические антитела связываться и с hPD-1, и с hCTLA-4, осуществляли анализ ELISA, как описано ниже. 96-луночный планшет для ELISA (Nunc MaxiSorp, ThermoFisher) покрывали 0,5 мкг/мл антигена-1 (hPD-1-ECD, W305-hPro1.ECD.mFc) в карбонат-бикарбонатном буфере в течение ночи при 4°C. После 1-часовой стадии блокирования 2% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина (Pierce), растворенного в PBS, серийные разведения разных биспецифических антител против PD-1×CTLA-4 в PBS, содержащем 2% BSA, инкубировали на планшетах в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты три раза промывали 300 мкл PBS, содержащего 0,5% (об./об.) Tween 20, на лунку. В планшеты добавляли 0,5 мкг/мл антигена-2 (hCTLA-4-ECD, W316-hPro1.ECD.hFc.биотин) и инкубировали смесь в течение 1 ч. После трехкратной промывки планшетов добавляли стрептавидин-HRP (Life Technologies, #SNN1004) (разведенный 1:20000) и инкубировали на планшетах в течение 1 ч при комнатной температуре. После шестикратной промывки 300 мкл PBS, содержащего 0,5% (об./об.) Tween 20, на лунку, для детекции добавляли 100 мкл субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) на лунку. Реакцию останавливали через приблизительно 5 мин посредством добавления 100 мкл 2 М HCl на лунку. Поглощение в лунках измеряли при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения многолуночных планшетов (SpectraMax® M5e).

Двойное связывание hPD-1 и hCTLA-4 по результатам FACS Для тестирования того, могут ли биспецифические антитела связываться и с hPD-1, и с hCTLA-4, осуществляли анализ FACS, как описано ниже. Сконструированные экспрессирующие PD-1 и CTLA-4 человека клетки W305-CHO-S.hPro1.C6 и W316-293F.hPro1.F1 окрашивали кальцеин-AM (Corning-354216) в количестве 50 нМ и Fag red (Invitrogen-C34572) в количестве 20 нМ, соответственно, в течение 20 мин при 37°C. После двукратной промывки 1% (мас./об.) бычьим сывороточным альбумином (Pierce) в PBS смешанные клетки с hPD-1 (5E4) и hCTLA-4 (5E4) высевали в количестве 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (COSTAR 3799). После удаления супернатанта к клеткам добавляли антитела, серийно разведенные в 3 раза 1% BSA/DPBS от 7,5 нМ до 0,83 нМ. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1,5 ч.

Клетки тестировали посредством проточной цитометрии и анализировали процент двойных положительных клеток с помощью FlowJo.

Конкурентный анализ PD-1 человека посредством FACS.

Для тестирования того, могут ли биспецифические антитела блокировать связывание hPD-L1 с белком hPD-1, осуществляли конкурентный анализ FACS. В кратком изложении, сконструированные экспрессирующие PD-1 человека клетки W305-CHO-S.hPro1.C6 (собственное производство) высевали в количестве 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном (COSTAR 3799), к клеткам добавляли от 200 нМ до 0,002 нМ PD-L1 человека вместе с 5 мкг/мл белка PD-L1 человека W315-hPro1.ECD.mFc. Планшеты инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки определяли связывание W315-hPro1.ECD.mFc с клетками, экспрессирующими PD-1 человека, с помощью FITC-меченого антитела козы против антитела мыши (Abcam 98716 1:125). Конкурентное связывание антитела с клетками тестировали посредством проточной цитометрии и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью FlowJo.

Блокада связывания CTLA-4 человека/яванского макака с CD80 человека.

Для тестирования того, могут ли биспецифические антитела блокировать связывание hCTLA-4 с белком hCD80, использовали ELISA. В кратком изложении, плоскодонные 96-луночные планшеты (Nunc MaxiSorp, ThermoFisher) предварительно покрывали 0,5 мкг/мл W316-hPro1.ECD.hFc в течение ночи при 4°C. После блокирования с помощью 2% BSA в каждую лунку пипеткой добавляли 100 мкл титрованных в 3,16 раза Ab в количестве от 400 нМ до 0,04 нМ вместе с 0,5 мкг/мл белка CD80 человека W316-hPro1L1.ECD.His и инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды. После инкубации планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBS, содержащего

0,5% (об./об.) Tween 20, на лунку. На планшет добавляли 100 мкл 0,5 мкг/мл меченого биотином mAb против His (GenScript-A00613) на лунку и инкубировали в течение 1 ч. После шестикратной промывки связывание W315-hPro1L1.ECD.His с WBP316-hPro1.ECD.hFc определяли с помощью стрептавидина-HRP (Life Technologies, #SNN1004) (разведенного 1:20000). Окраску проявляли, добавляя 100 мкл субстрата TMB, а затем останавливая реакцию с помощью 100 мкл 2 N HCl. Поглощение определяли при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов (SpectraMax® M5e).

Конкурентный анализ FACS использовали для тестирования того, могут ли антитела блокировать связывание CTLA-4 человека или яванского макака с hCD80 на поверхности клеток. В кратком изложении, экспрессирующие CD80 человека клетки CHO-K1 добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета (COSTAR 3799) в количестве 1×10^5 на лунку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 4 мин при 4°C перед удалением супернатанта. Серийные разведения тестируемых антител, положительные и отрицательные контроли смешивали с биотинилированным CTLA-4.ECD.hFc человека. Из-за разной плотности лигандов на поверхности клеток, в случае клеток, экспрессирующих CD80 человека, использовали 0,066-0,037 мкг/мл hCTLA-4.ECD.hFc-биотин. Затем смеси антитела и CTLA-4 добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Клетки два раза промывали 200 мкл промывочного буфера для FACS (DPBS, содержащего 1% BSA). К клеткам добавляли стрептавидин-PE (BD Pharmingen-554061), разведенный 1:600 в буфере для FACS, и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. Дополнительные стадии промывки осуществляли два раза с использованием 200 мкл промывочного буфера для FACS с последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 4 мин при 4°C. И наконец, клетки ресуспендировали в 100 мкл промывочного буфера для FACS, измеряли значения флуоресценции посредством проточной цитометрии и анализировали их с помощью FlowJo.

Аффинность к CTLA-4 и PD-1.

Для измерения константы скорости прямой реакции (k_a) и константы скорости обратной реакции (k_d) связывания антител с ECD CTLA-4 или PD-1 использовали технологию SPR. Таким образом, определяли константу аффинности (KD).

Устройство Biacore T200, сенсорный чип CM5 серии S, набор для соединения по аминокислоте и 10-кратный HBS-EP приобретали в GE Healthcare. Антитело козы против Fc IgG человека приобретали в Jackson ImmunoResearch Lab (кат. № 109-005-098). На стадии иммобилизации получали активационный буфер посредством смешивания 400 mM EDC и 100 mM NHS непосредственно перед впрыскиванием. Сенсорный чип CM5 активировали в течение 420 с с помощью активационного буфера. Затем в каналы Fc1-Fc4 впрыскивали 30 мкг/мл антитела козы против Fc γ человека в 10 mM NaAc (pH 4,5) в течение 200 с при скорости потока 5 мкл/мин. Чип дезактивировали 1 M этаноламино-НCl (GE). Затем антитела захватывали на чипе. В кратком изложении, 4 мкг/мл антител в подвижном буфере (HBS-EP+) впрыскивали отдельно в канал Fc3 в течение 30 с при скорости потока 10 мкл/мин. Восемь разных концентраций (20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 и 0,15625 нМ) анализа ECD CTLA-4 или PD-1 и пустой подвижный буфер впрыскивали по порядку в каналы Fc1-Fc4 при скорости потока 30 мкл/мин в фазу ассоциации в течение 120 с с последующей фазой диссоциации в течение 2400 с. Буфер для регенерации (10 mM глицина, pH 1,5) впрыскивали со скоростью 10 мкл/мин в течение 30 с после каждой фазы диссоциации.

Стабильность в сыворотке человека.

Антитела инкубировали в свежely выделенной сыворотке человека при 37°C. В указанные моменты времени аликвоты обработанной сывороткой образца удаляли из инкубатора и быстро замораживали в жидком азоте, а затем хранили при -80°C до анализа двойного связывания посредством ELISA. Замороженные образцы быстро размораживали непосредственно перед анализом стабильности. В кратком изложении, планшеты предварительно покрывали 0,5 мкг/мл hCTLA4.ECD.hFc (собственное производство) при 4°C в течение ночи. После блокирования в течение 1 ч тестируемые антитела добавляли в планшеты в различных концентрациях. Планшеты инкубировали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. После инкубации планшеты три раза промывали 300 мкл PBS, содержащего 0,5% (об./об.) Tween 20, на лунку. Затем в планшеты добавляли 0,1 мкг/мл hPD-1-ECD.биотин и инкубировали смесь в течение 1 ч. После трехкратной промывки планшетов добавляли стрептавидин-HRP (Life Technologies, #SNN1004) (разведенный 1:20000) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После шестикратной промывки 300 мкл PBS, содержащего 0,5% (об./об.) Tween 20, на лунку, для детекции добавляли 100 мкл субстрата тетраметилбензидина (TMB) на лунку. Реакцию останавливали через приблизительно 5 мин посредством добавления 100 мкл 2 M HCl на лунку. Поглощение в лунках измеряли при 450 нм с использованием спектрофотометра для чтения многолуночных планшетов (SpectraMax® M5e).

Результаты.

Экспрессия и очистка биспецифических антител.

Чистота биспецифических антител, анализируемая посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS (фиг. 56A) и SEC-ВЭЖХ (фиг. 56B), составляла более 90%.

DSF WuXiBody.

DSF использовали для измерения T_m WuXiBody. Как показано на фиг. 57, W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP имеют T_m 60,8 и 63,4°C, соответственно.

Связывание PD-1 человека и яванского макака.

Биспецифические антитела могут связываться с PD-1 человека (фиг. 58) и PD-1 яванского макака (фиг. 59). По результатам FACS активность связывания W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP с PD-1 человека

была немного лучше, чем WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP. W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP имели аффинность к PD-1 человека 1,24 нМ и 1,32 нМ, соответственно (фиг. 62).

Связывание с CTLA-4 человека и яванского макака.

Очищенные биспецифические антитела связывались с CTLA-4 человека, что тестировали посредством FACS (фиг. 60). Два биспецифических антитела также связывались с CTLA-4 яванского макака (фиг. 61). W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP имели аффинность к CTLA-4 человека 0,0356 нМ и 0,357 нМ, соответственно (фиг. 62).

Одновременное связывание с CTLA-4 и PD-1.

Для тестирования того, могут ли биспецифические антитела связываться с обеими мишенями, использовали ELISA и FACS. При ELISA планшет покрывали PD-1 человека. После добавления биспецифических антител биотинилированный CTLA-4 использовали для детекции связанных биспецифических антител. Как показано на фиг. 66, W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP могут связываться и с PD-1, и с CTLA-4 с EC_{50} от 0,1072 до 0,0710 нМ, что сравнимо с референсным биспецифическим антителом WBP324 ВМК1 ($EC_{50}=0,0599$ нМ). При FACS и W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP, и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP могли одновременно связываться с PD-1⁺ и CTLA-4⁺ клетками (фиг. 67).

Блокирование связывания CTLA-4 человека или яванского макака с CD80.

Конкурентный анализ FACS использовали для тестирования блокирования связывания CTLA-4 с его лигандом CD80 с помощью биспецифических антител. W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP блокировали связывание CTLA-4 с CD80 с IC_{50} 4,300 и 0,7581 нМ (фиг. 64). Аналогично, биспецифические антитела также могли блокировать связывание CTLA-4 яванского макака с клетками, положительными по CD80 человека (фиг. 65).

Блокирование связывания PD-1 с его лигандами.

Конкурентный анализ FACS использовали для тестирования блокирования связывания PD-1 с его лигандом PD-L1 с помощью биспецифических антител. W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP блокировали связывание PD-1 с PD-L1 с IC_{50} 1,670 нМ и 1,917 нМ (фиг. 63).

Стабильность в сыворотке.

Два биспецифические антитела инкубировали при 37°C в сыворотке человека в течение 14 дней и измеряли их двойное связывание с CTLA-4 и PD-1 человека посредством ELISA. Как показано на фиг. 68А и 68В, двойное связывание W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP и WBP3248-U6T5.G25-1-uIgG4.SP с мишенями не изменялось с течением времени, что свидетельствует о том, что эти два биспецифических антитела являлись стабильными в сыворотке человека при 37°C в течение по меньшей мере 14 дней.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, специалисту в этой области следует понимать, что можно осуществлять различные изменения формы и деталей настоящего изобретения без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, как представлено в настоящем описании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептидный комплекс, содержащий

первый полипептид, содержащий с N-конца к С-концу первый переменный домен тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанный с первой константной областью (C1) Т-клеточного рецептора (TCR), и

второй полипептид, содержащий с N-конца к С-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR,

где C1 и C2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между C1 и C2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер,

где первый VH функционально связан с C1 в первом соединительном домене и первый VL функционально связан с C2 во втором соединительном домене,

где C1 содержит сконструированную С-бета и C2 содержит сконструированную С-альфа;

C1 содержит сконструированную С-бета и C2 содержит сконструированную С-пре-альфа; или

C1 содержит сконструированную С-гамма и C2 содержит сконструированную С-дельта; или

C1 содержит сконструированную С-дельта и C2 содержит сконструированную С-гамма; и

где первое антитело имеет первую антигенную специфичность.

2. Полипептидный комплекс по п.1, где ненативная межцепочечная связь образуется между первым мутантным остатком, содержащимся в C1, и вторым мутантным остатком, содержащимся в C2, необязательно где по меньшей мере один из первого и второго мутантных остатков является остатком цистеина.

3. Полипептидный комплекс по п.1 или 2, где по меньшей мере один нативный остаток цистеина отсутствует в C1 и/или C2 и/или где по меньшей мере один нативный участок N-гликозилирования отсутствует в C1 и/или C2.

4. Полипептидный комплекс по любому из пп.1-3, где димер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ненативных межцепочечных связей, необязательно где по меньшей мере одна из ненативных межцепочечных связей является дисульфидной связью.

5. Полипептидный комплекс по любому из пп.1-4, где сконструированная С-бета не сохраняет петлю FG, охватывающую аминокислотные остатки 101-107 нативной С-бета, и/или петлю DE, охватывающую аминокислотные остатки 66-71 нативной С-бета.

6. Полипептидный комплекс по п.5, где:

(а) сконструированная С-альфа содержит любую из SEQ ID NO: 43-48 и/или сконструированная С-бета содержит любую из SEQ ID NO: 33-41,

(b) сконструированная С-пре-альфа содержит любую из SEQ ID NO: 82-83, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 или 318 и/или сконструированная С-бета содержит любую из SEQ ID NO: 84, 33-41, 319, 320, 321, 322, 323 или 324, или

(с) сконструированная С-гамма содержит любую из SEQ ID NO: 113, 114, 333, 334 или 335, 336, 337, 338, 339 или 340 и/или сконструированная С-дельта содержит любую из SEQ ID NO: 115, 116, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 или 332.

7. Полипептидный комплекс по п.5 или 6, где:

(а) С1 содержит сконструированную С-бета и С2 содержит сконструированную С-альфа и где первый соединительный домен представляет собой SEQ ID NO: 49, 50, 129 или 130 и/или второй соединительный домен содержит или представляет собой SEQ ID NO: 51 или 52,

(b) С1 содержит сконструированную С-бета и С2 содержит сконструированную С-пре-альфа и где первый соединительный домен содержит SEQ ID NO: 49, 50, 132 или 133 и/или второй соединительный домен содержит SEQ ID NO: 81 или 131,

(с) С1 содержит сконструированную С-гамма и С2 содержит сконструированную С-дельта и где первый соединительный домен представляет собой SEQ ID NO: 117 или 118 и/или второй соединительный домен представляет собой SEQ ID NO: 119 или 120, или

(d) С1 содержит сконструированную С-дельта и С2 содержит сконструированную С-гамма и где первый соединительный домен представляет собой SEQ ID NO: 123 или 124 и/или второй соединительный домен представляет собой SEQ ID NO: 125 или 126.

8. Конъюгат, содержащий полипептидный комплекс по любому из пп.1-7, конъюгированный с фрагментом, где указанный фрагмент представляет собой детектируемую метку, модифицирующий фармакокинетику фрагмент, фрагмент для очистки, цитотоксический фрагмент, антитело или фрагмент антитела.

9. Способ получения полипептидного комплекса по любому из пп.1-7, включающий:

а) введение в клетку-хозяина

первого полинуклеотида, кодирующего первый полипептид, содержащий с N-конца к С-концу первую переменную область тяжелой цепи (VH) первого антитела, функционально связанную с первой константной областью (C1) TCR, и

второго полинуклеотида, кодирующего второй полипептид, содержащий с N-конца к С-концу первый переменный домен легкой цепи (VL) первого антитела, функционально связанный со второй константной областью (C2) TCR,

где С1 и С2 могут образовывать димер, содержащий по меньшей мере одну ненативную межцепочечную связь между С1 и С2, и ненативная межцепочечная связь может стабилизировать димер, и первое антитело имеет первую антигенную специфичность, и

б) экспрессию полипептидного комплекса в клетке-хозяине;

где указанный способ включает:

с) введение в клетку-хозяина одного или более дополнительных полинуклеотидов, кодирующих второй антигенсвязывающий фрагмент, где второй антигенсвязывающий фрагмент имеет вторую антигенную специфичность, отличающуюся от первой антигенной специфичности, и

д) экспрессию биспецифического полипептидного комплекса клеткой-хозяином;

где указанный способ дополнительно включает выделение полипептидного комплекса или биспецифического полипептидного комплекса.

10. Полипептидный комплекс по любому из пп.5-7, где:

(а) сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 9-35, 52-66, 71-86 и 122-127; и/или

сконструированная С-альфа содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 6-29, 37-67 и 86-95;

(b) сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 9-35, 52-66, 71-86 и 122-127; и/или

сконструированная С-пре-альфа содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 7-19, 26-34, 56-75 и 103-106; или

(с) сконструированная С-дельта содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 8-26, 43-64 и 84-88; и/или

сконструированная С-гамма содержит мутантный остаток цистеина в области контакта, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков 11-35 и 55-76.

11. Полипептидный комплекс по любому из пп.5-7, где:

(а) сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S56C, S16C, F13C, V12C, E14C, F13C, L62C, D58C, S76C

и R78C, и/или сконструированная С-альфа содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из T49C, Y11C, L13C, S16C, V23C, Y44C, T46C, L51C и S62C, необязательно где сконструированная С-бета и сконструированная С-альфа содержат пару мутантных остатков цистеина, которыми заменяют пару аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S56C в С-бета и T49C в С-альфа, S16C в С-бета и Y11C в С-альфа, F13C в С-бета и L13C в С-альфа, S16C в С-бета и L13C в С-альфа, V12C в С-бета и S16C в С-альфа, E14C в С-бета и S16C в С-альфа, F13C в С-бета и V23C в С-альфа, L62C в С-бета и Y44C в С-альфа, D58C в С-бета и T46C в С-альфа, S76C в С-бета и T46C в С-альфа, S56C в С-бета и L51C в С-альфа, S56C в С-бета и S62C в С-альфа и R78C в С-бета и S62C в С-альфа, и где указанная пара остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь, дополнительно необязательно где отсутствует нативный остаток цистеина в положении С74 сконструированной С-бета;

(b) сконструированная С-бета содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S16C, A18C, E19C, F13C, A11C, S56C и S76C, и/или сконструированная С-пре-альфа содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S11C, A13C, I16C, S62C, T65C и Y59, необязательно где сконструированная С-бета и сконструированная С-пре-альфа содержат пару мутантных остатков цистеина, которыми заменяют пару аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из S16C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, A18C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, E19C в С-бета и S11C в С-пре-альфа, F13C в С-бета и A13C в С-пре-альфа, S16C в С-бета и A13C в С-пре-альфа, A11C в С-бета и I16C в С-пре-альфа, S56C в С-бета и S62C в С-пре-альфа, S56C в С-бета и T65C в С-пре-альфа и S76C в С-бета и Y59C в С-пре-альфа, и где указанная пара мутантных остатков цистеина может образовывать ненативную межцепочечную дисульфидную связь; или

(c) сконструированная С-гамма содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из S17C, E20C, F14C, T12C, M62C, Q57C и A19C, и/или сконструированная С-дельта содержит мутантный остаток цистеина, которым заменяют аминокислотный остаток в положении, выбранном из F12C, M14C, N16C, D46C, V50C, F87C и E88C, необязательно где сконструированная С-гамма и сконструированная С-дельта содержат пару мутантных остатков цистеина, которыми заменяют пару аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из Q57C в С-гамма и V50C в С-дельта, A19C в С-гамма и E88C в С-дельта, S17C в С-гамма и F12C в С-дельта, E20C в С-гамма и F12C в С-дельта, F14C в С-гамма и M14C в С-дельта, T12C в С-гамма и N16C в С-дельта, M62C в С-гамма и D46C в С-дельта и A19C в С-гамма и F87C в С-дельта, и где указанная пара мутантных остатков цистеина может образовывать межцепочечную дисульфидную связь.

12. Полипептидный комплекс по любому из пп.5-7, где:

(a) по меньшей мере один нативный участок гликозилирования отсутствует в сконструированной С-бета и/или сконструированной С-альфа, необязательно где нативный участок гликозилирования в сконструированной С-бета представляет собой N69, и/или нативный участок (нативные участки) гликозилирования в сконструированной С-альфа выбран(ы) из N34, N68, N79 и любой их комбинации;

(b) по меньшей мере один нативный участок гликозилирования отсутствует в сконструированной С-бета и/или сконструированной С-пре-альфа, необязательно где отсутствующий участок гликозилирования в сконструированной С-бета представляет собой N69, и/или отсутствующий участок гликозилирования в сконструированной С-пре-альфа представляет собой N50; или

(c) по меньшей мере один нативный участок гликозилирования отсутствует в сконструированной С-гамма и/или сконструированной С-дельта, необязательно где нативный участок гликозилирования в сконструированной С-гамма представляет собой N65, и/или нативный участок (нативные участки) гликозилирования в сконструированной С-дельта представляет (представляют) собой один или оба из N16 и N79.

13. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептидный комплекс по любому из пп.1-7.

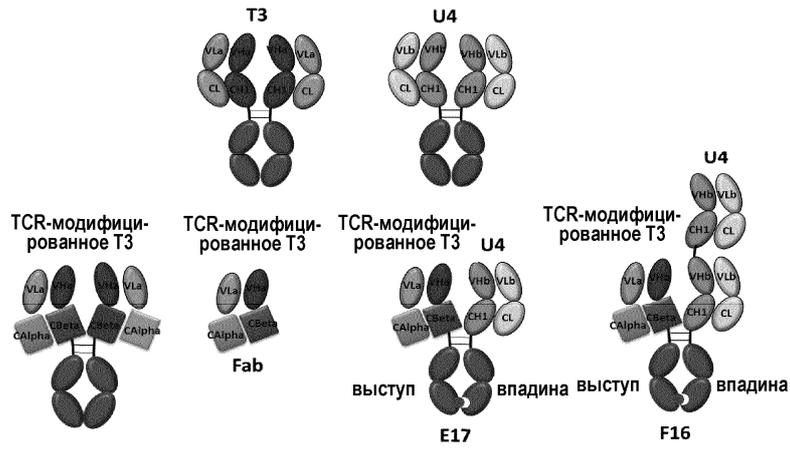
14. Выделенный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по п.13.

15. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.13 или выделенный вектор по п.14.

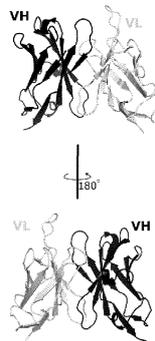
16. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептидный комплекс по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Применение полипептидного комплекса по любому из пп.1-7 для производства лекарственного средства для лечения состояния у нуждающегося в этом индивидуума, где указанное лекарственное средство вводят в терапевтически эффективном количестве.

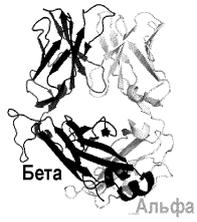
18. Полипептидный комплекс по любому из пп.1-7, где С1 или С2 содержит сконструированную С-альфа и по меньшей мере один нативный остаток Ser в сконструированной С-альфа подвергают мутации для снижения O-гликозилирования, необязательно где мутантный аминокислотный остаток выбран из S19, S36, S41, S91 и S94.



Фиг. 1



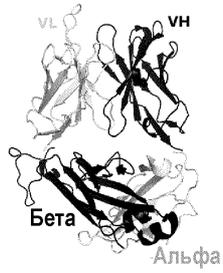
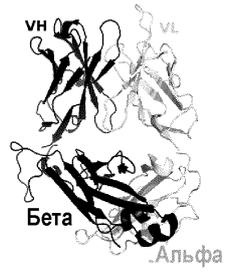
Фиг. 2А



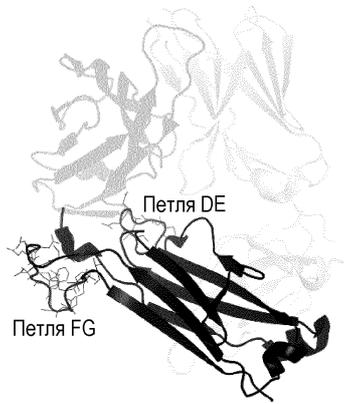
Фиг. 2В



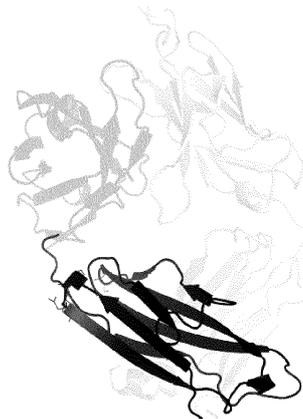
045653



Фиг. 2D

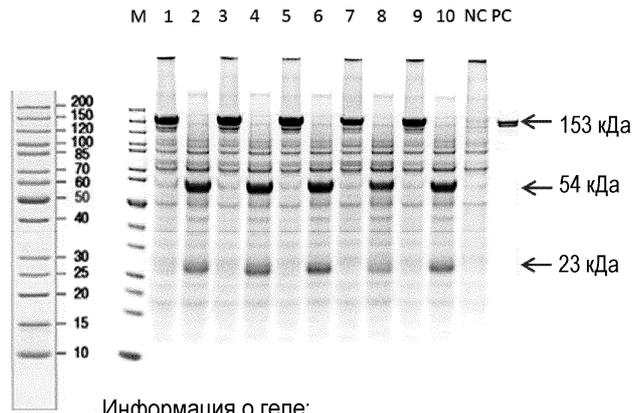


Фиг. 3А



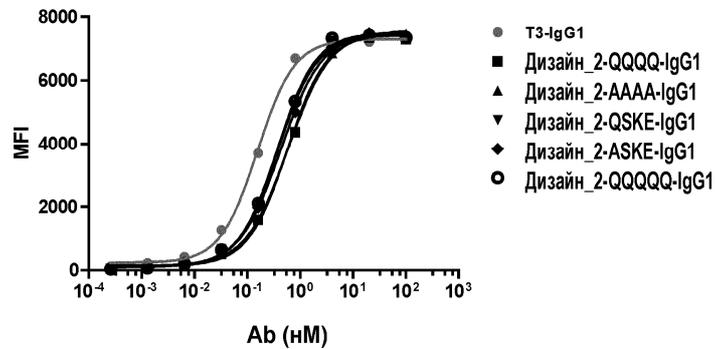
Фиг. 3В

045653

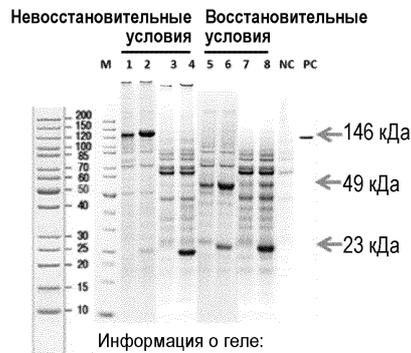


Фиг. 4

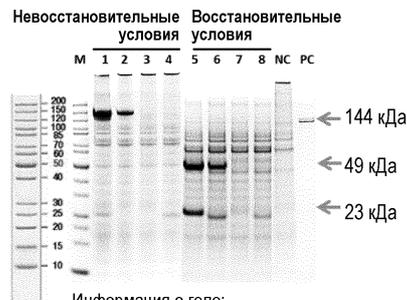
Клеточный анализ связывания CD3 на клетках Jurkat



Фиг. 5



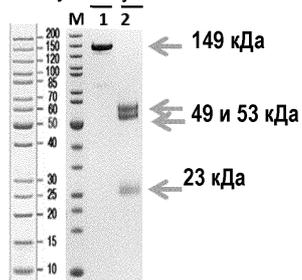
Фиг. 6А



Фиг. 6В

045653

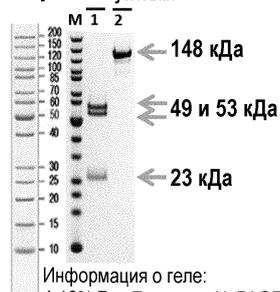
Невосстановит. условия Восстановительные условия



Информация о геле:
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex

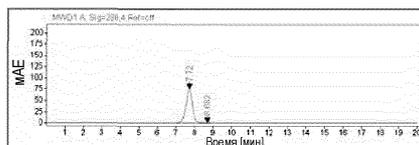
Фиг. 7А

Восстановительные условия Невосстановительные условия

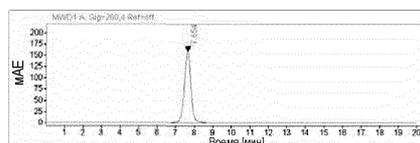


Информация о геле:
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex

Фиг. 7В

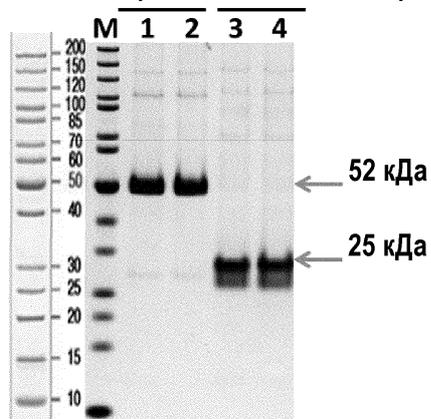


Фиг. 7С



Фиг. 7D

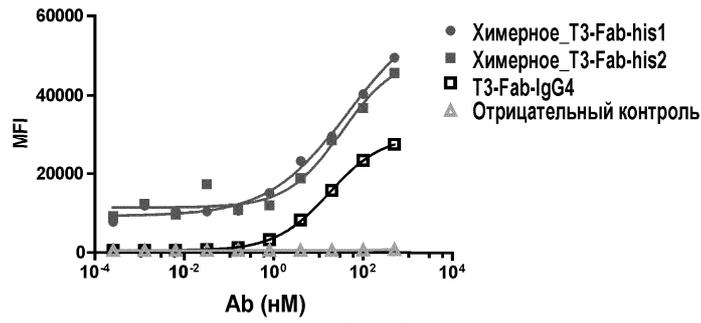
Невосстановительные условия Восстановительные условия



Информация о геле: 4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex

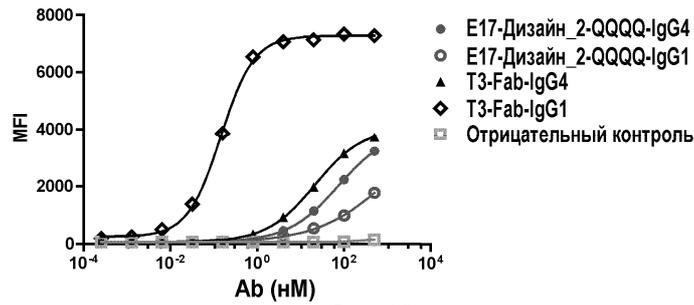
Фиг. 8

Клеточный анализ связывания CD3 на клетках Jurkat



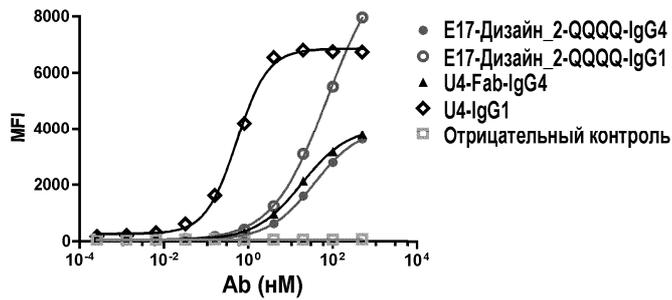
Фиг. 9

Клеточный анализ связывания CD3 на клетках Jurkat



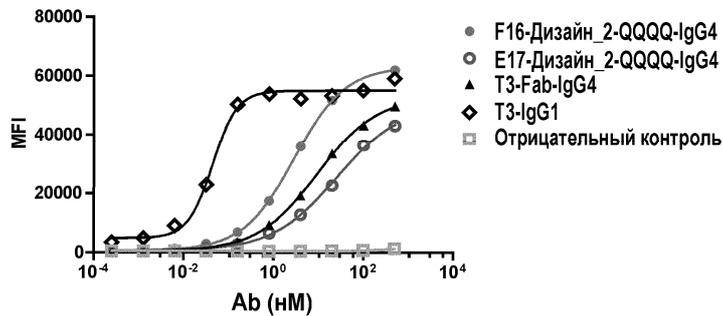
Фиг. 10А

Клеточный анализ связывания CD10 на клетках Ramos



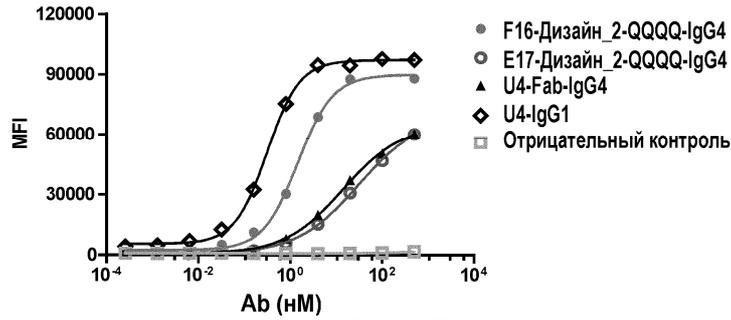
Фиг. 10В

Клеточный анализ связывания CD3 на клетках Jurkat



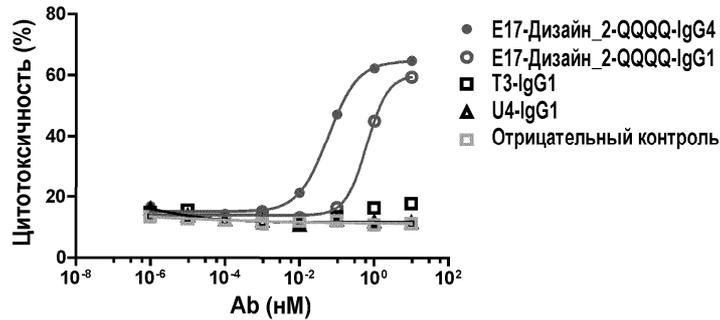
Фиг. 11А

Клеточный анализ связывания CD19 на клетках Ramos



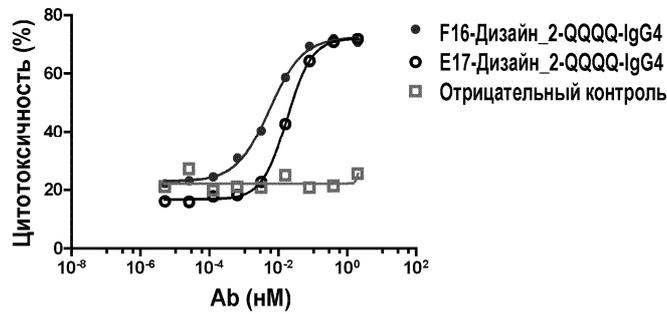
Фиг. 11В

Цитотоксичность В-клеток Raji

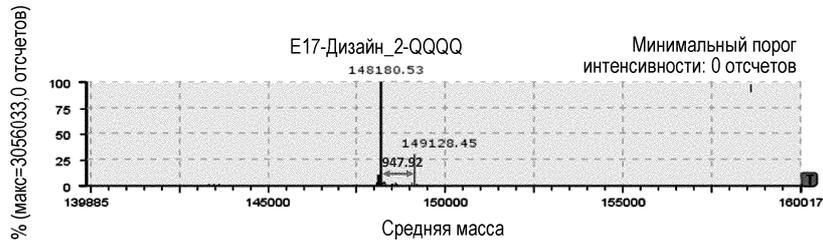


Фиг. 12

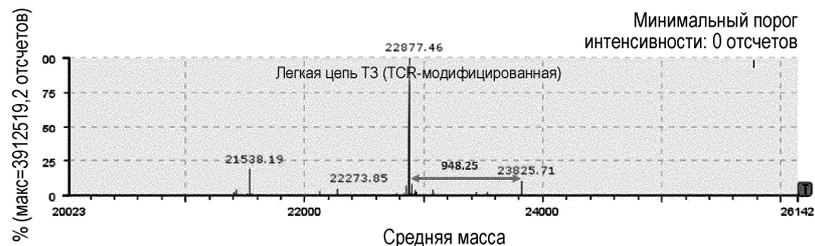
Цитотоксичность В-клеток Raji



Фиг. 13



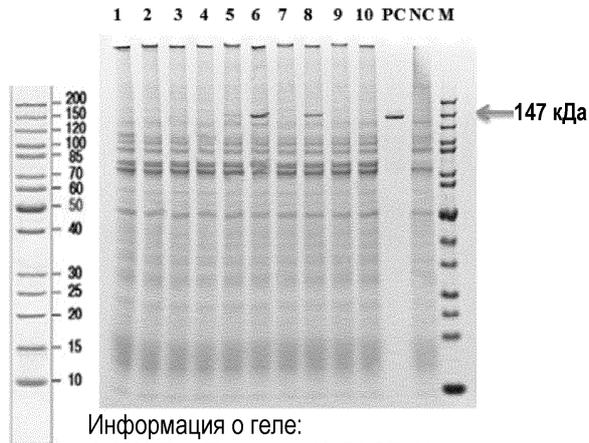
Фиг. 14А



Фиг. 14В

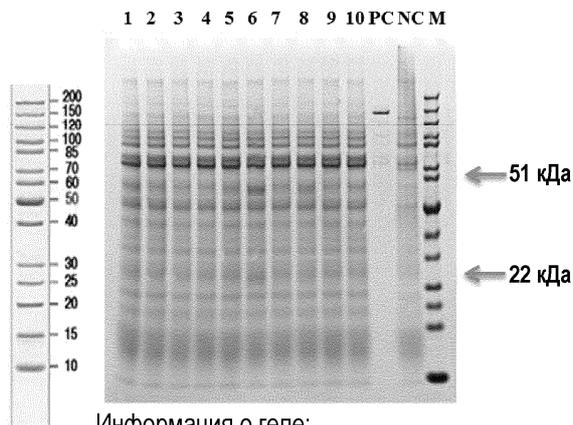
045653

Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS
в невосстановительных условиях



Информация о геле:
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex
Невосстановительные условия
Фиг. 17А

Электрофорез в ПААГ в присутствии SDS
в восстановительных условиях



Информация о геле:
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex
Восстановительные условия
Фиг. 17В

Последовательность константной области альфа-цепи TCR:

TRAC_человек
4L4T_Альфа_Кристалл

PNTQNPDPAY YQLRDSKSSD KSVCLFTDFD SQTNVSQSKD SDVYITDKTV
PDIQNPDPAY YQLRDSKSSD KSVCLFTDFD SQTNVSQSKD SDVYITDKCV

TRAC_человек
4L4T_Альфа_Кристалл

LDMRSMDFKS NSAVAWSNKS DFACANAFNN SIIPEDTFPP SPESSCDVKL
LDMRSMDFKS NSAVAWSNKS DFACANAFNN SIIPEDTFPP SPESS----

TRAC_человек
4L4T_Альфа_Кристалл

VEKSPETDTN LNFQNLVIG FRILLKLVAG FNLLMTRLRW SS SEQ ID NO:254
----- SEQ ID NO:255

Фиг. 18А

Последовательность константной области бета-цепи TCR:

TRBC1_человек	EDLNKVFPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFPPDH VELSWVWNGK
TRBC2_человек	-DLKNVFPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFPPDH VELSWVWNGK
4L4T_Бета_Кристалл	EDLNKVFPE VAVFEPSEAE ISHTQKATLV CLATGFPPDH VELSWVWNGK
TRBC1_человек	EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRVCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF
TRBC2_человек	EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRVCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF
4L4T_Бета_Кристалл	EVHSGVSTDP QPLKEQPALN DSRVCLSSRL RVSATFWQNP RNHFRCQVQF
TRBC1_человек	YGLSENDEWT QDRAKPVTVI VSAEAWGRAD CGFTSVSYQQ GVLSATILYE
TRBC2_человек	YGLSENDEWT QDRAKPVTVI VSAEAWGRAD CGFTSESYQQ GVLSATILYE
4L4T_Бета_Кристалл	YGLSENDEWT QDRAKPVTVI VSAEAWGRAD -----
TRBC1_человек	ILLGKATLYA VLVSALVIMA MVKRRDF- SEQ ID NO:256
TRBC2_человек	ILLGKATLYA VLVSALVIMA MVKRRDSRG SEQ ID NO:257
4L4T_Бета_Кристалл	----- SEQ ID NO:258

Фиг. 18B

Последовательность константной области пре-альфа-цепи:

PTCRA_ЧЕЛОВЕК	MAGTWLLLLL ALGCPALPTG VGGTPPPSLA PPIMLLVDGK QQMVVYCLVL
30F6_Пре-альфа_Кристалл	----- -GAMPTG VGGTPPPSLA PPIMLLVDGK QQMVVYCLVL
PTCRA_ЧЕЛОВЕК	DVAPPGLDSP IWFSAGNGSA LDAFTYGPSP ATDGTWTNLA HLSLPEELA
30F6_Пре-альфа_Кристалл	DVAPPGLDSP IWFSAGNGSA LDAFTYGPSP ATDGTWTNLA HLSLPEELA
PTCRA_ЧЕЛОВЕК	SWEPLVCHTG PGAEGHSRST QPMHLSGEAS TARTCPQEPL RGTGGALWL
30F6_Пре-альфа_Кристалл	SWEPLVCHTG PGAEGHSRST QPMHLSGEAS TARTC-SGDD DDK-----
PTCRA_ЧЕЛОВЕК	GVLRLLLFKL LLDLTLTCS CLCDPAGPLP SPATTRLRA LGSRLHPAT
30F6_Пре-альфа_Кристалл	-----
PTCRA_ЧЕЛОВЕК	ETGGREATSS PRPQPRDRRW GDTPPGRKPG SPVWGEPSYL SYPPTCPAQA
30F6_Пре-альфа_Кристалл	-----
PTCRA_ЧЕЛОВЕК	WCSRSALRAP SSSLGAFFAG DLPPPLQAGA A SEQ ID NO:259
30F6_Пре-альфа_Кристалл	----- SEQ ID NO:260

Фиг. 18C

Последовательность константной области дельта-цепи:

TRA@_человек	MLFSSLLCVF VAFSYSGSSV AQKVTQAQSS VSMFVRKAVT LNCLYETSWW
4LFH_Дельта_Кристалл	----- -ETG AQKVTQAQSS VSMFVRKAVT LNCLYETSWW
TRA@_человек	SYIIFWYKQL PSKEMIFLIR QGSDEQNAKS GRYSVNFKKA AKSVALTISA
4LFH_Дельта_Кристалл	SYIIFWYKQL PSKEMIFLIR QGSDEQNAKS GRYSVNFKKA AKSVALTISA
TRA@_человек	LQLEDSAKYF CALGESFLPF RGNFHYIDKL IFGKGRVTV EPRSQPHTKP
4LFH_Дельта_Кристалл	LQLEDSAKYF CALD----- -PGGLNIDKL IFGKGRVTV EPRSQPHTKP
TRA@_человек	SVFVMKNGTN VACLKVEFYP KDIRINLVSS KKITEFDPAL VISPSGKYNA
4LFH_Дельта_Кристалл	SVFVMKNGTN VACLKVEFYP KDIRINLVSS KKITEFDPAL VISPSGKYNA
TRA@_человек	VKLGKYEDSN SVTCSVQHDN KTVHSTDPEV KTDSTDHVKP KETENTKQPS
4LFH_Дельта_Кристалл	VKLGKYEDSN SVTCSVQHDN KTVHSTDPEV KTDSTDHVKP KETENTKQPS
TRA@_человек	K-SCHKPKA IVHTEKVNMM SLTVLGLRML FAKTAVNPL LTAKLFFL SEQ ID NO:261
4LFH_Дельта_Кристалл	KSASGLVPR----- SEQ ID NO:262

Фиг. 18D

Последовательность константной области гамма-цепи:

TRGC1_человека	DKQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQKAGTY LCLLEKFPD VIKIHWQEKK
4LFH_Гамма_Кристалл	DKQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQKAGTY LCLLEKFPD VIKIHWQEKK
TRGC2_человека	DKQLDADVSP KPTIFLPSIA ETKLQKAGTY LCLLEKFPD IIKIHWQEKK
TRGC1_человека	SNTILGSQEG NTMKTNDTYM KFSWLTVPEK SLDKEHRCIV RHENKNGVD
4LFH_Гамма_Кристалл	SNTILGSQEG NTMKTNDTYM KFSWLTVPEE SLDKEHRCIV RHENKNGVD
TRGC2_человека	SNTILGSQEG NTMKTNDTYM KFSWLTVPEE SLDKEHRCIV RHENKNGID
TRGC1_человека	QEIIFFPIKT DVITMDPKD----- -NCSKD ANDTLLQLT
4LFH_Гамма_Кристалл	QEIIFFPIKT DVITMDPKD----- -N-----
TRGC2_человека	QEIIFFPIKT DVITMDPKDS YSKDANDVIT MDPKDNWSKD ANDTLLQLT
TRGC1_человека	NTSAYMYLL LLLSVVYFA IITCCLLRRT AFCNGEKS SEQ ID NO:263
4LFH_Гамма_Кристалл	-ASG----- -LVPR----- SEQ ID NO:264
TRGC2_человека	NTSAYMYLL LLLSVVYFA IITCCLLGRV AFCNGEKS SEQ ID NO:265

Фиг. 18E

Нумерация константной области альфа-цепи:

	1	11	21	31	50	
TRAC_человек	PNIQNPDPAV	YQLRDSKSSD	KSVCLFTDFD	SQTNVSQSKD	SDVYITDKTV	
4L4T_Альфа_Кристалл	PDIQNPDPAV	YQLRDSKSSD	KSVCLFTDFD	SQTNVSQSKD	SDVYITDKCV	
E17_Дизайн_2_QQQQ_IgG4	PDIQNPDPAV	YQLRDSKSSD	KSVCLFTDFD	SQTQVSQSKD	SDVYITDKCV	
	51	61	71	81	95	SEQ ID NO:
TRAC_человек	LDMRSMDFKS	NSAVAWSNKS	DFACANAFNN	SIIPEDTFFP	SPESS	239
4L4T_Альфа_Кристалл	LDMRSMDFKS	NSAVAWSNKS	DFACANAFNN	SIIPEDTFFP	SPESS	240
E17_Дизайн_2_QQQQ_IgG4	LDMRSMDFKS	NSAVAWSQKS	DFACANAFNN	SIIPEDTFFP	SPESS	241

Фиг. 19А

Нумерация константной области бета-цепи:

	0	1	11	21	31	50	
TRGC1_человека	E	DLKLVFPPEV	AVFEPSEAEI	SHTQKATLVC	LATGFYDPHV	ELSWVWNGKE	
4L4T_Альфа_Кристалл	LE	DLKLVFPPEV	AVFEPSEAEI	SHTQKATLVC	LATGFYDPHV	ELSWVWNGKE	
E17_Дизайн_2_QQQQ_IgG4	LE	DLKLVFPPEV	AVFEPSEAEI	SHTQKATLVC	LATGFYDPHV	ELSWVWNGKE	
	51	61	71	81	100		
TRGC1_человека	VHSGVSTDPQ	PLKEQPALND	SRYCLSSRLR	VSATFWQNP	NHFRQVQFY		
4L4T_Альфа_Кристалл	VHSGVCTDPQ	PLKEQPALND	SRYALSSRLR	VSATFWQNP	NHFRQVQFY		
E17_Дизайн_2_QQQQ_IgG4	VHSGVCTDPQ	PLKEQPALND	SRYALSSRLR	VSATFWQNP	NHFRQVQFY		
	101	111	124	128		SEQ ID NO:	
TRGC1_человека	GLSENDEWTQ	DRAKPVTVIV	SAEA	WGRA		242	
4L4T_Альфа_Кристалл	GLSENDEWTQ	DRAKPVTVIV	SAEA	WGRA		243	
E17_Дизайн_2_QQQQ_IgG4	GLSENDEWTQ	DRAKPVTVIV	SAEA	WGRA		244	

Фиг. 19В

Нумерация константной области пре-альфа-цепи:

	1	11	21	31	50	
PTCRA_человек	PTGVGGTPPP	SLAPPIMLLV	DGKQMVVVC	LVLDVAPPGL	DSPIWFSAGN	
30F6_Пре-Альфа_Кристалл	PTGVGGTPPP	SLAPPIMLLV	DGKQMVVVC	LVLDVAPPGL	DSPIWFSAGN	
Дизайн_6_Пре_TCR_Конструкция1_Cys14	PTGVGGTPPP	CLAPPIMLLV	DGKQMVVVC	LVLDVAPPGL	DSPIWFSAGQ	
	51	61	71	81	100	
PTCRA_человек	GSALDAFTYG	PSPATDGTWT	NLAHLSLPSE	ELASWEPLVC	HTGPGAEGHS	
30F6_Пре-Альфа_Кристалл	GSALDAFTYG	PSPATDGTWT	NLAHLSLPSE	ELASWEPLVC	HTGPGAEGHS	
Дизайн_6_Пре_TCR_Конструкция1_Cys14	GSALDAFTYG	PSPATDGTWT	NLAHLSLPSE	ELASWEPLVC	HTGPGAEGHS	
	101	117				SEQ ID NO:
PTCRA_человек	RSTQPMHLSG	EASTART				245
30F6_Пре-Альфа_Кристалл	RSTQPMHLSG	EASTART				246
Дизайн_6_Пре_TCR_Конструкция1_Cys14	RSTQPMHLSG	EASTART				247

Фиг. 19С

Нумерация константной области дельта-цепи:

	0	1	11	21	31	50	
TRA@_человек	E	PRSQPHTKPS	VFVMKNGTNV	ACLVKEFYPK	DIRINLVSSK	KITEFDPAIV	
4LFH_Дельта_Кристалл	E	PRSQPHTKPS	VFVMKNGTNV	ACLVKEFYPK	DIRINLVSSK	KITEFDPAIV	
Дизайн_2_Cys5_без_гликозил.р.	E	PRSQPHTKPS	VFVMKNGTNV	ACLVKEFYPK	DIRINLVSSK	KITEFDPAIV	
	51	61	71	88		SEQ ID NO:	
TRA@_человек	ISPSGKYNAV	KLKGYEDSNS	VTCSVQHDK	TVHSTDFE		248	
4LFH_Дельта_Кристалл	ISPSGKYNAV	KLKGYEDSNS	VTCSVQHDK	TVHSTDFE		249	
Дизайн_2_Cys5_без_гликозил.р.	ISPSGKYNAV	KLKGYEDSNS	VTCSVQHDK	TVHSTDFC		250	

Фиг. 19D

Нумерация константной области пре-альфа-цепи:

		01	11	21	31	50
TRGC1_человек	TD	KQLDADVSPK	PTIFLPSIAE	TKLQKAGTYL	CLEKFFPDV	IKIHWQEKKS
4LFH_Гамма_Кристалл	TD	KQLDADVSPK	PTIFLPSIAE	TKLQKAGTYL	CLEKFFPDV	IKIHWQEKKS
Дизайн_2_Сус5_без_гликозил.	TD	KQLDADVSPK	PTIFLPSICE	TKLQKAGTYL	CLEKFFPDV	IKIHWQEKKS
		51	61	71	81	100
TRGC1_человек		NTILGSQEGN	TMKTNDTYMK	FSWLTVPES	LDKEHRCIVR	HENNKNGVDQ
4LFH_Гамма_Кристалл		NTILGSQEGN	TMKTNDTYMK	FSWLTVPES	LDKEHRCIVR	HENNKNGVDQ
Дизайн_2_Сус5_без_гликозил.		NTILGSQEGN	TMKTQDTYMK	FSWLTVPES	LDKEHRCIVR	HENNKNGVDQ
		101	SEQ ID NO:			
TRGC1_человек		EIIF	251			
4LFH_Гамма_Кристалл		EIIF	252			
Дизайн_2_Сус5_без_гликозил.		EIIF	253			

Фиг. 19E

Положения мутаций-"выступов" в IgG1:

		1			50
IgG1_дикий тип		EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR
IgG1_выступ		EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR
		51			100
IgG1_дикий тип		VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV
IgG1_выступ		VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV
		101			150
IgG1_дикий тип		GKEYCKVSN	KALPAITEKT	ISKARGQPRE	PQVYTLPPSR
IgG1_выступ		GKEYCKVSN	KALPAITEKT	ISKARGQPRE	PQVYTLPPCR
		151			200
IgG1_дикий тип		TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTT	PVLDSGSEFF
IgG1_выступ		WCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTT	PVLDSGSEFF
		201		232	SEQ ID NO:
IgG1_дикий тип		RWQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK
IgG1_выступ		RWQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK

Фиг. 20A

Положения мутаций-"выступов" в IgG4:

		1			50
IgG4_дикий тип		ESKYGPPCPP	CPAPEFLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE
IgG4_выступ		ESKYGPPCPP	CPAPEFLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE
		51			100
IgG4_дикий тип		EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVVSVLTV
IgG4_выступ		EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVVSVLTV
		101			150
IgG4_дикий тип		YKCKVSNKGL	PSSIEKTIISK	AKGQPREPQV	YTLPPSQEEM
IgG4_выступ		YKCKVSNKGL	PSSIEKTIISK	AKGQPREPQV	YTLPPSQEEM
		151			200
IgG4_дикий тип		VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	DSGSEFFLYS
IgG4_выступ		VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	DSGSEFFLYS
		201		229	SEQ ID NO:
IgG4_дикий тип		EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSLGK	297
IgG4_выступ		EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSLGK	298

Фиг. 20B

Положения мутаций-"впадин" в IgG1:

	1		50	
IgG1_дикий тип	EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
IgG1_впадина	EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR TPEVTCVVVD
	51		100	
IgG1_дикий тип	VSHEDEPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV LTVLHQDWLW
IgG1_впадина	VSHEDEPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV LTVLHQDWLW
	101		150	
IgG1_дикий тип	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL
IgG1_впадина	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL
	151		200	
IgG1_дикий тип	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTT	PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
IgG1_впадина	SCAVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTT	PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS
	201		232	SEQ ID NO:
IgG1_дикий тип	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK 294
IgG1_впадина	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP	GK 296

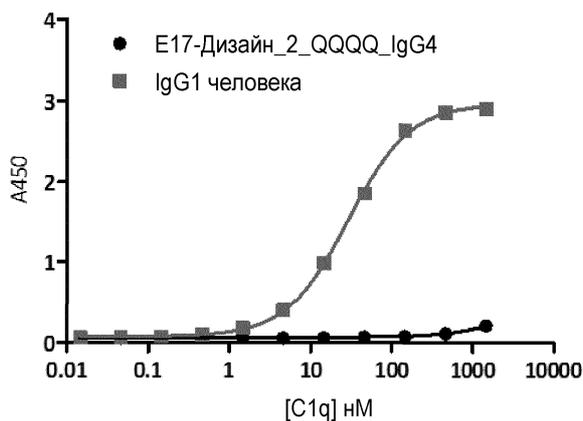
Фиг. 20С

Положения мутаций-"впадин" в IgG4

	1		50	
IgG4_дикий тип	ESKYGPPCPP	CPAPEFLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
IgG4_впадина	ESKYGPPCPP	CPAPEFLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ
	51		100	
IgG4_дикий тип	EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
IgG4_впадина	EDPEVQFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQFNS	TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE
	101		150	
IgG4_дикий тип	YKCKVSNKGL	PSSIETKISK	AKGQPREPQV	YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL
IgG4_впадина	YKCKVSNKGL	PSSIETKISK	AKGQPREPQV	CTLPPSQEEM TKNQVSLSCA
	151		200	
IgG4_дикий тип	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	DSGDSFFLYS RLTVDKSRWQ
IgG4_впадина	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	DSGDSFFLVS RLTVDKSRWQ
	201		229	SEQ ID NO:
IgG4_дикий тип	EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSLGK	297
IgG4_впадина	EGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSLGK	299

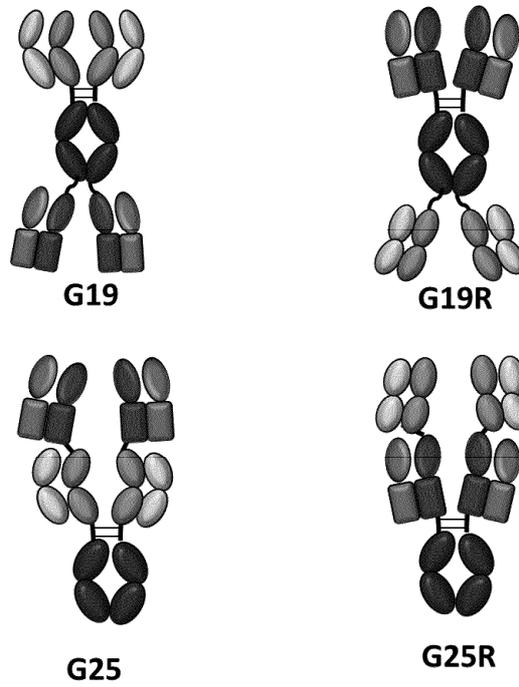
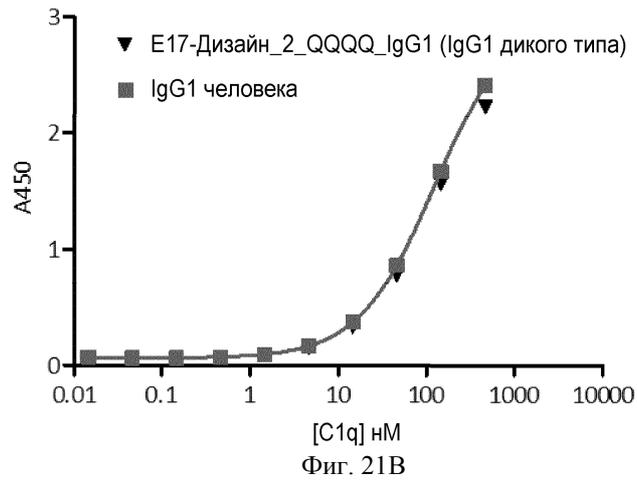
Фиг. 20D

Связывание IgG4 с C1q человека



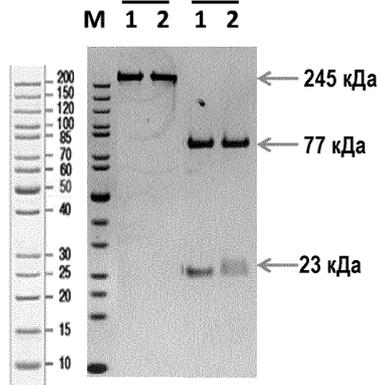
Фиг. 21А

Связывание IgG1 дикого типа с C1q человека

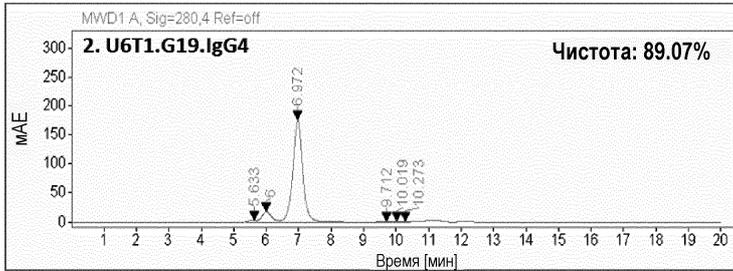
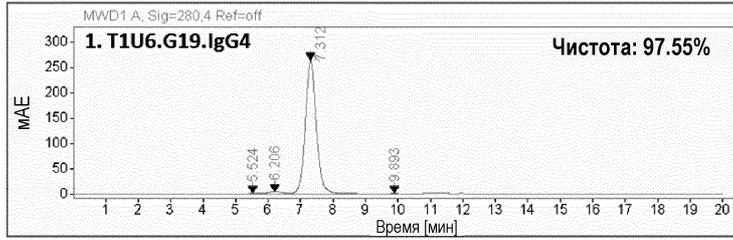


Фиг. 22

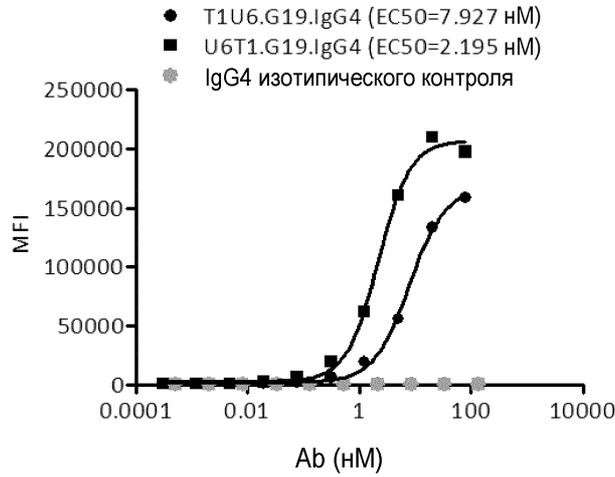
Невосстановительные условия Восстановительные условия



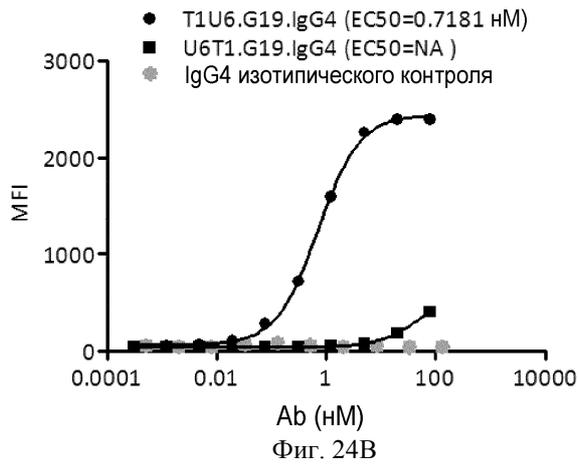
Информация о геле:
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex
Фиг. 23А



Фиг. 23В

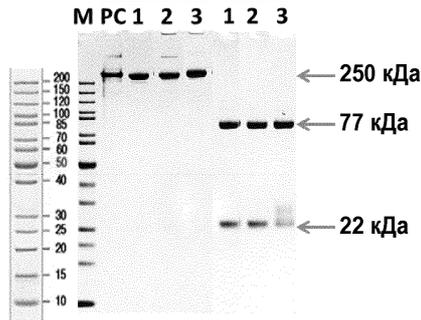


Фиг. 24А

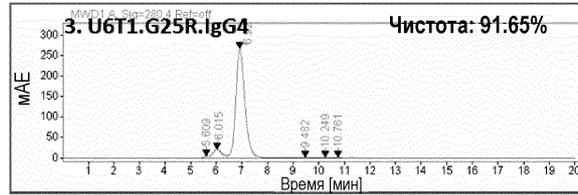
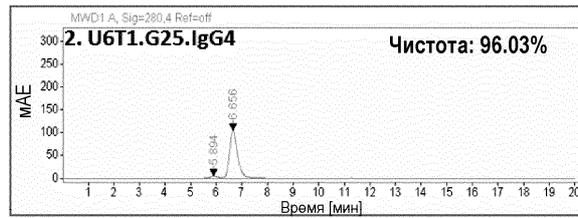
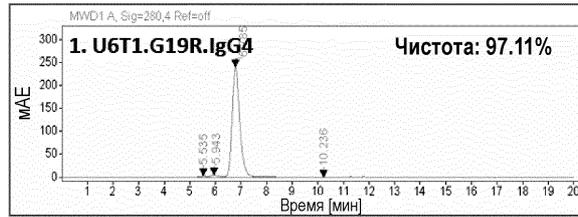


Фиг. 24В

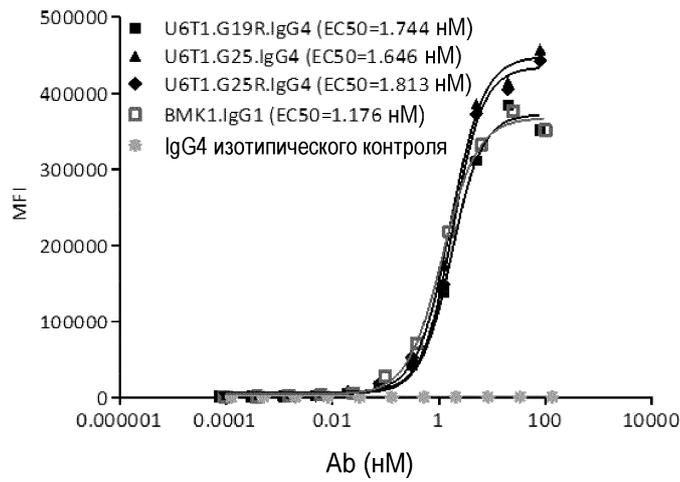
Невосстановительные условия Восстановительные условия



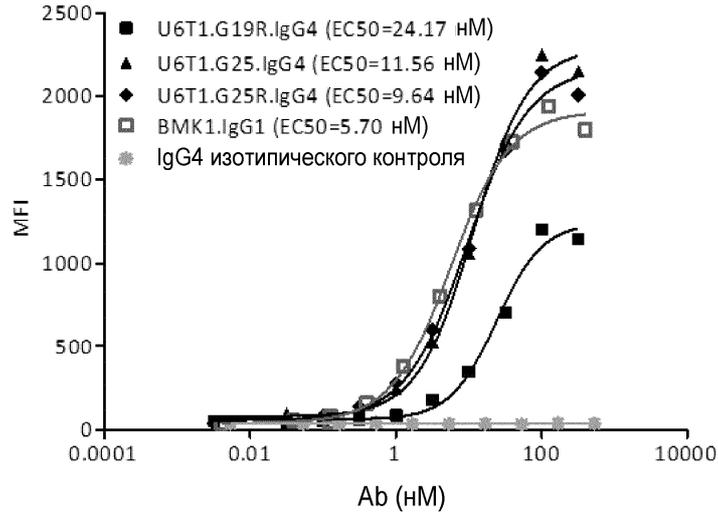
Информация о геле: v
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex
Фиг. 25А



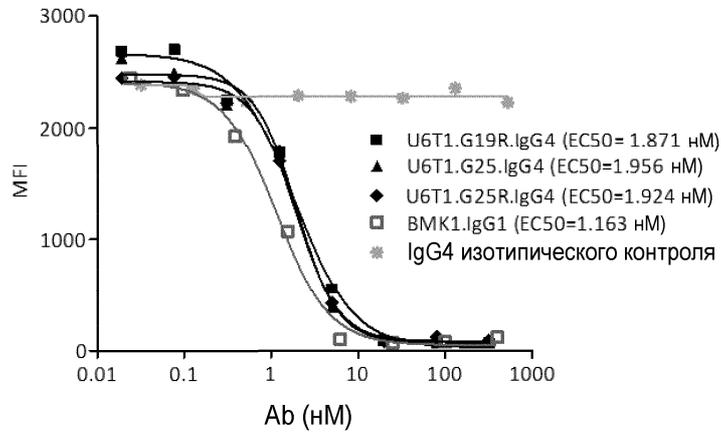
Фиг. 25В



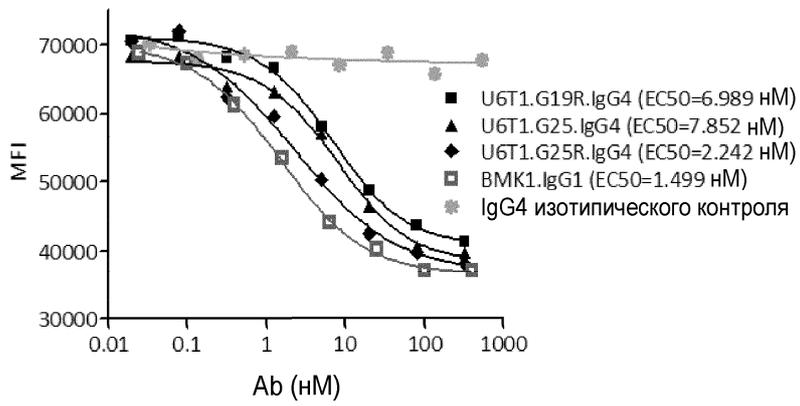
Фиг. 26А



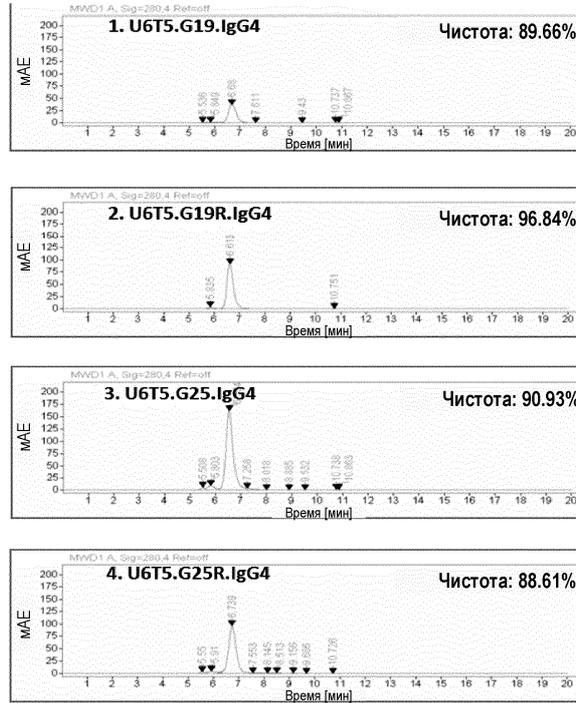
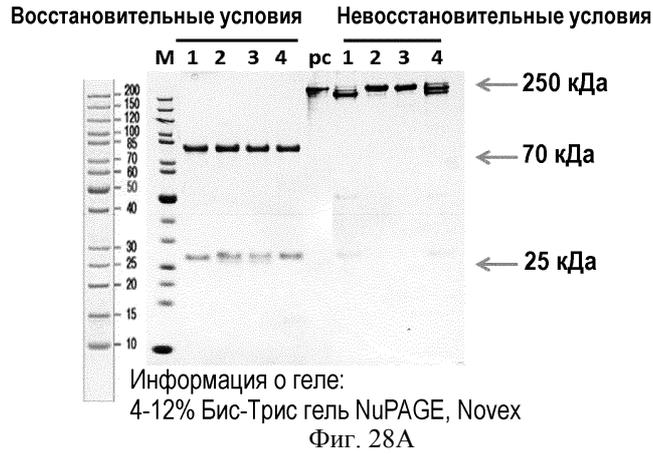
Фиг. 26В



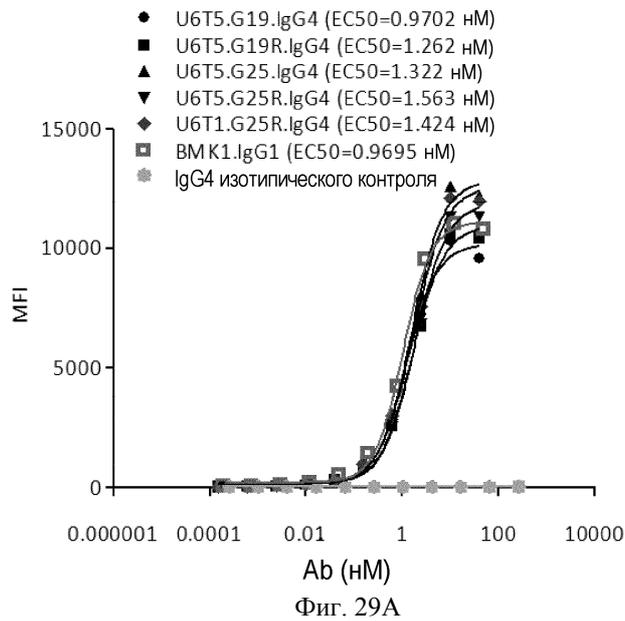
Фиг. 27А

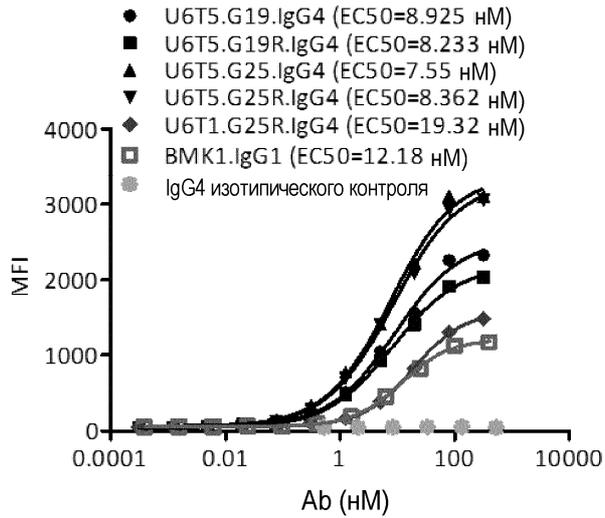


Фиг. 27В

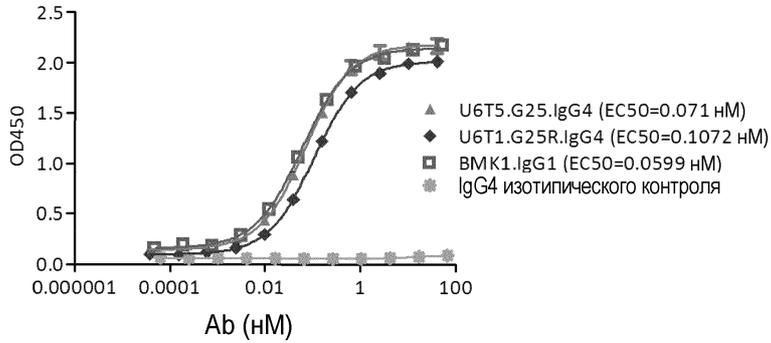


Фиг. 28В

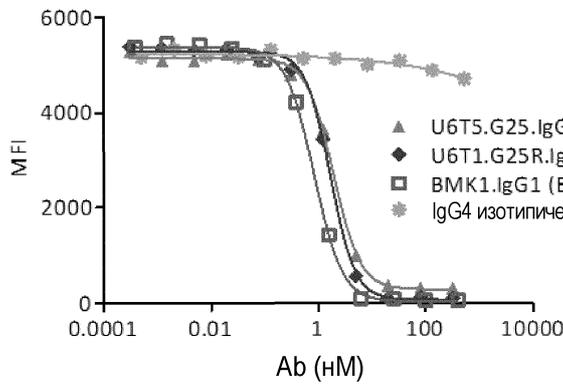




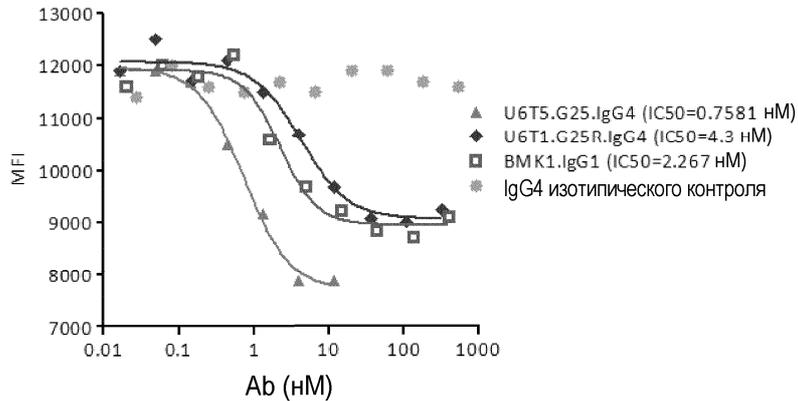
Фиг. 29В



Фиг. 30

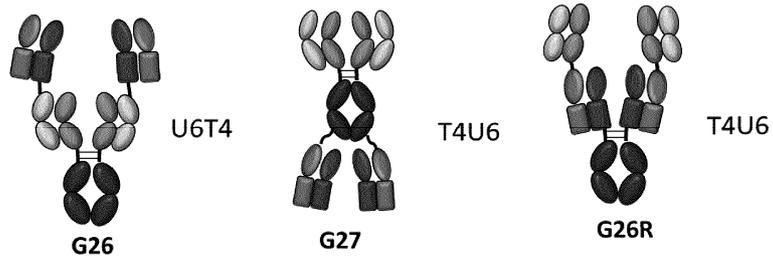


Фиг. 31А



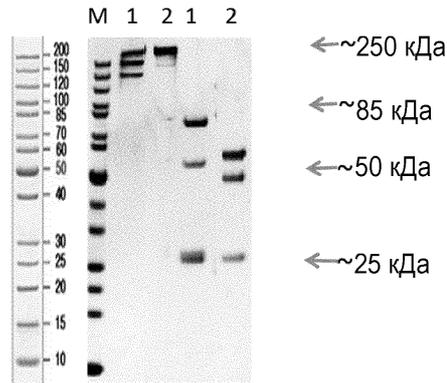
Фиг. 31В

045653

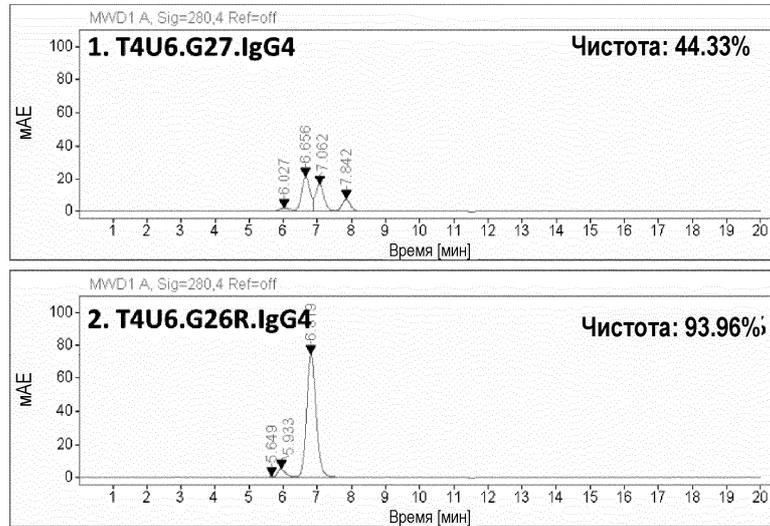


Фиг. 32

Невосстановительные условия Восстановительные условия

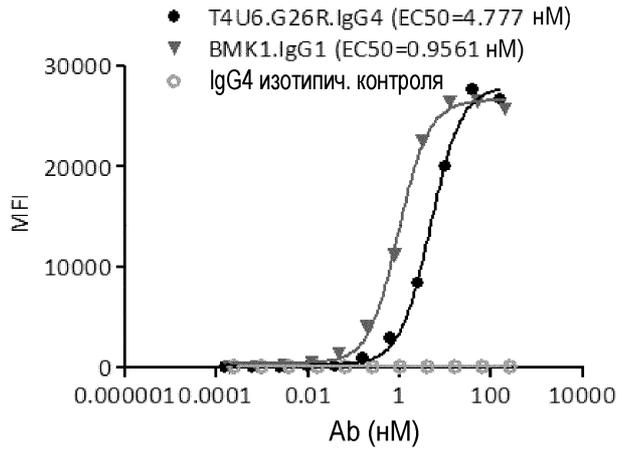


Информация о геле: v
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex
Фиг. 33А

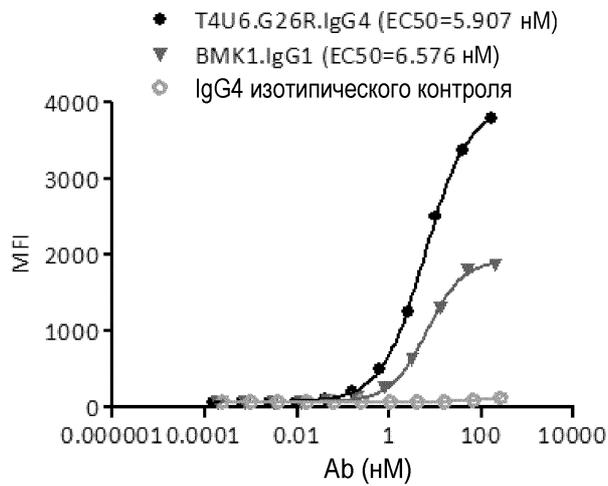


Фиг. 33В

045653

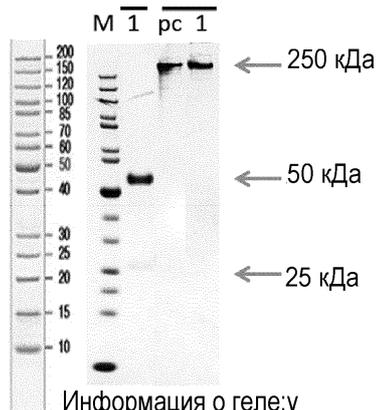


Фиг. 34А

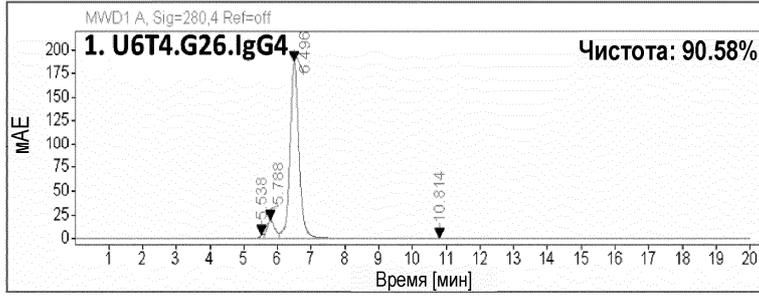


Фиг. 34В

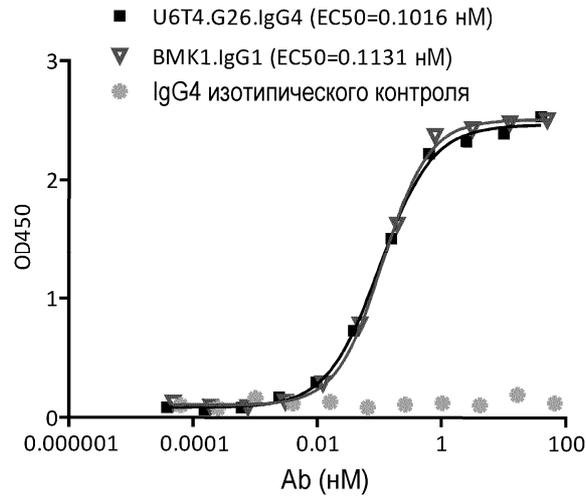
Восстановительные условия Невосстановительные условия



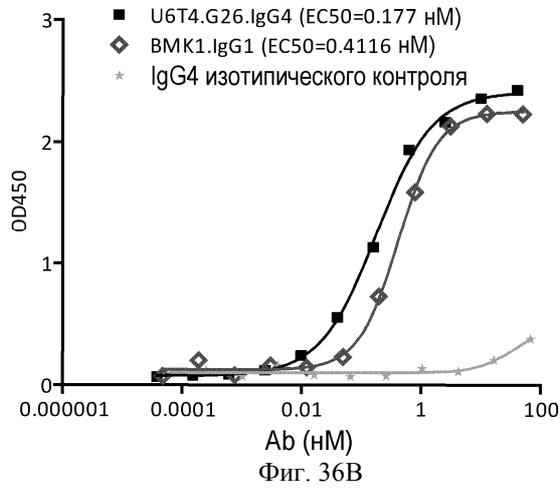
Информация о геле: v
4-12% Бис-Трис гель NuPAGE, Novex
Фиг. 35А



Фиг. 35В

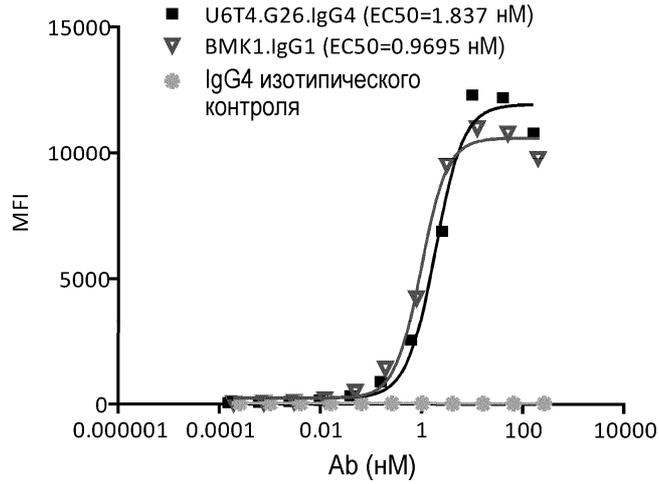


Фиг. 36А

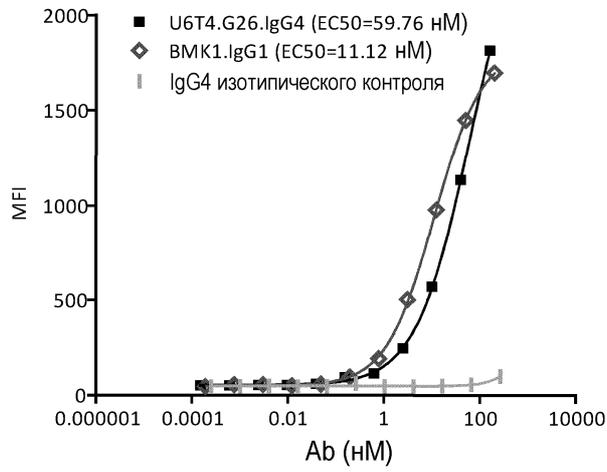


Фиг. 36В

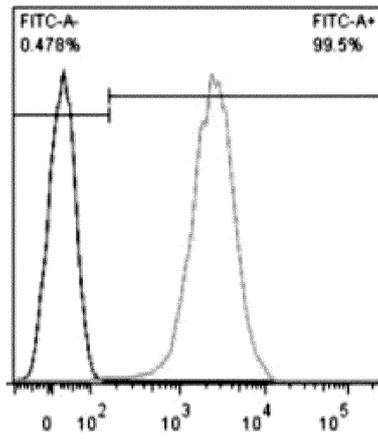
045653



Фиг. 36С

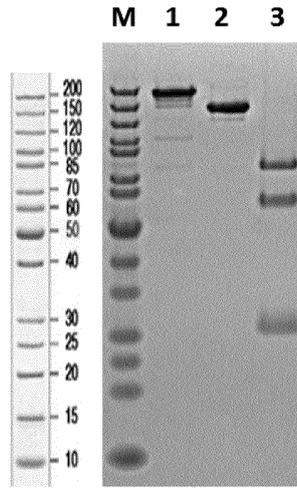


Фиг. 36D

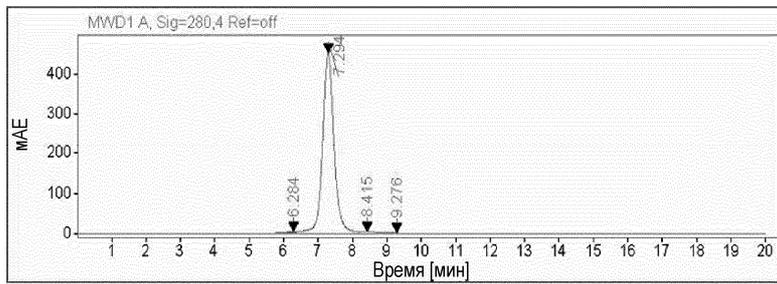


Фиг. 37

045653



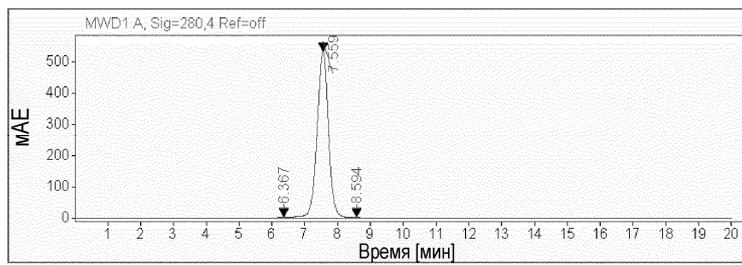
Фиг. 38



Фиг. 39

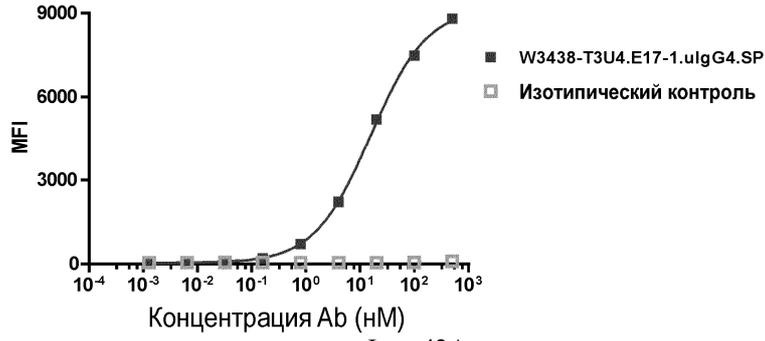


Фиг. 40



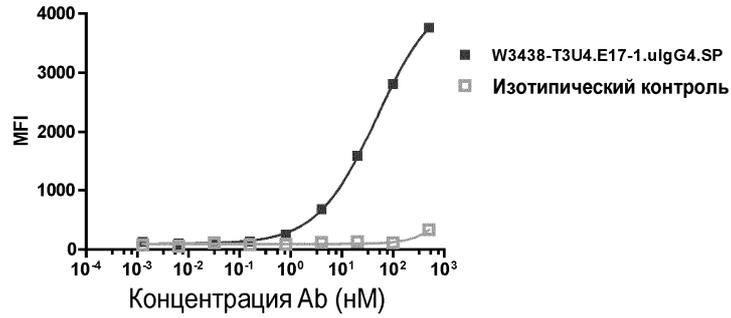
Фиг. 41

Связывание антител на клетках Ramos



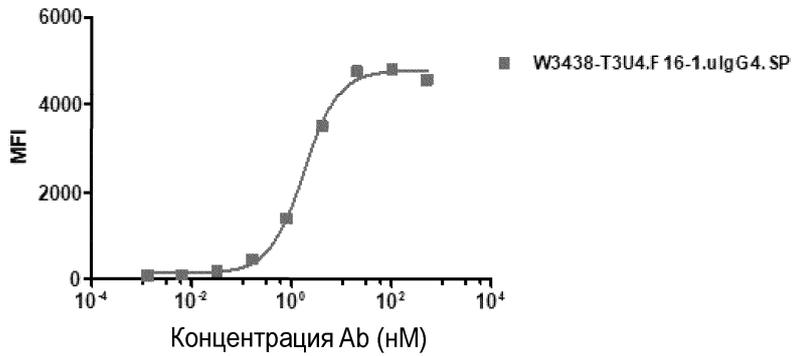
Фиг. 42А

Связывание антител на клетках Jurkat



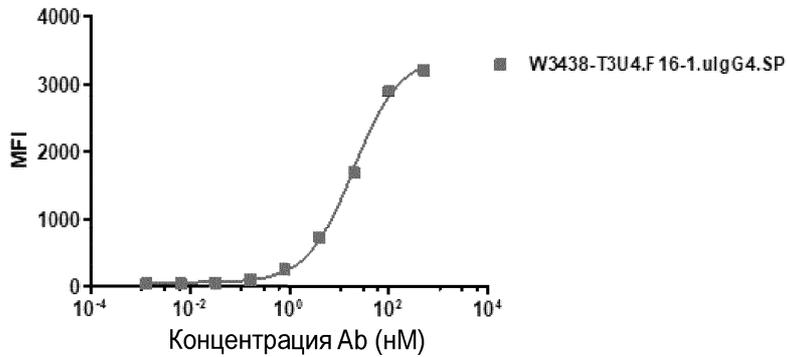
Фиг. 42В

Связывание антител на клетках Ramos



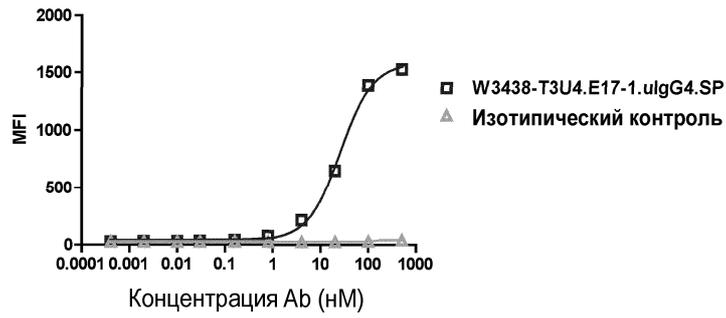
Фиг. 43А

Связывание антител на клетках Jurkat



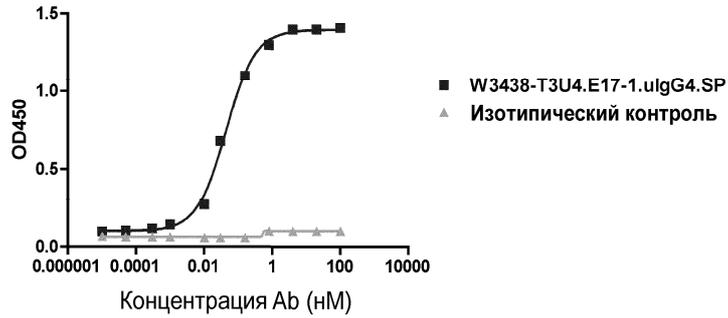
Фиг. 43В

Связывание с клетками, экспрессирующими CD19 яванского макака



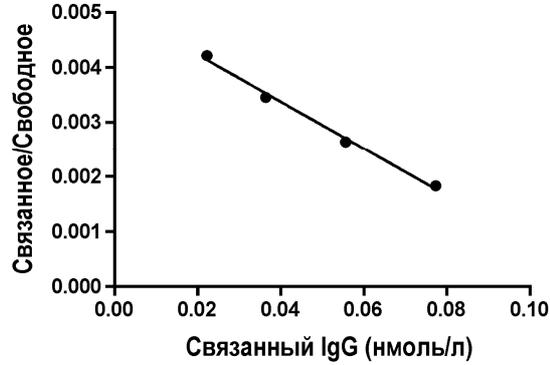
Фиг. 44

Связывание с белком CD3 яванского макака



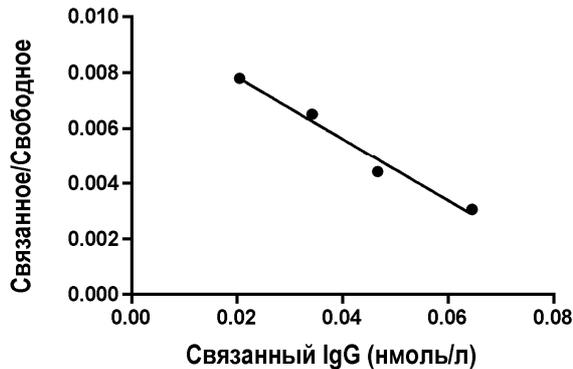
Фиг. 45

Анализ аффинности W3438-T3U4.E17-1.ulgG4.SP с использованием клеток Ramos

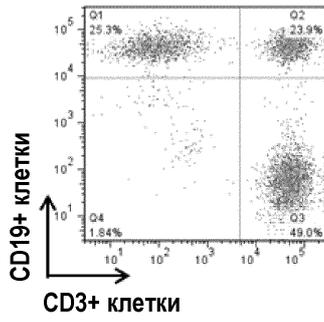


Фиг. 46А

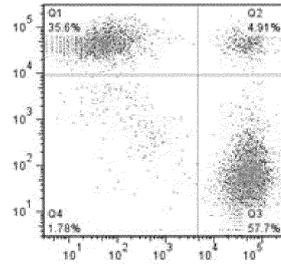
Анализ аффинности W3438-T3U4.E17-1.ulgG4.SP с использованием клеток Jurkat



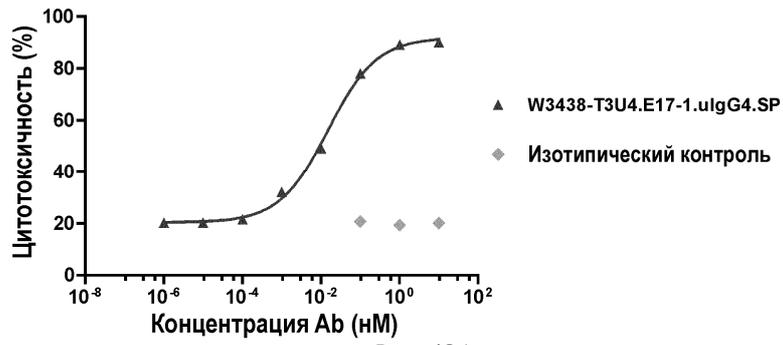
Фиг. 46В



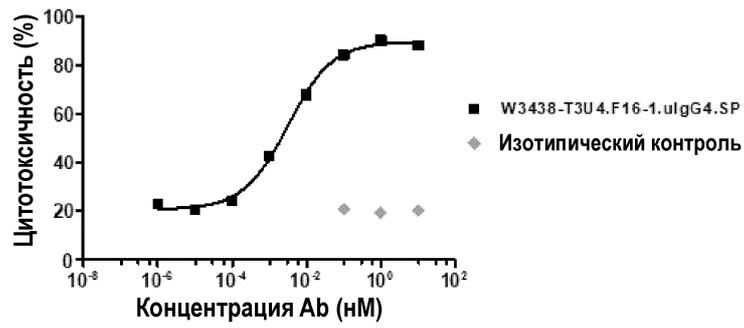
Фиг. 47А



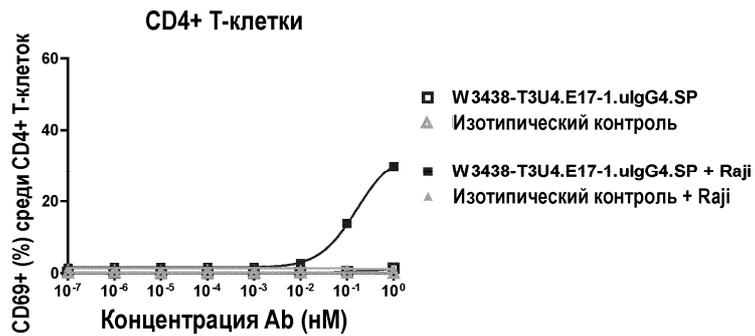
Фиг. 47В



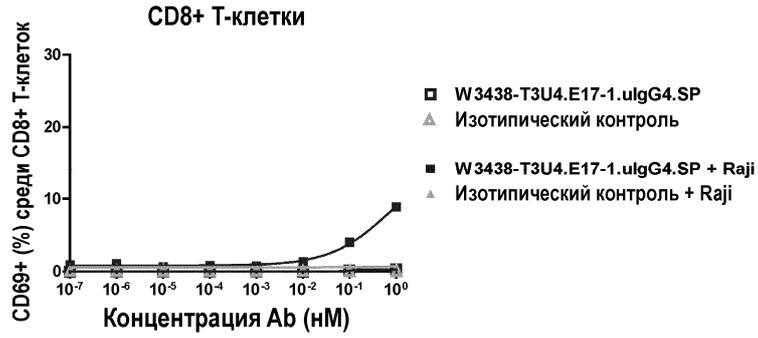
Фиг. 48А



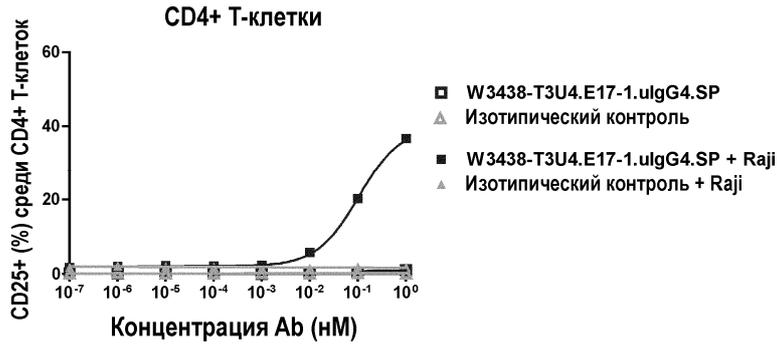
Фиг. 48В



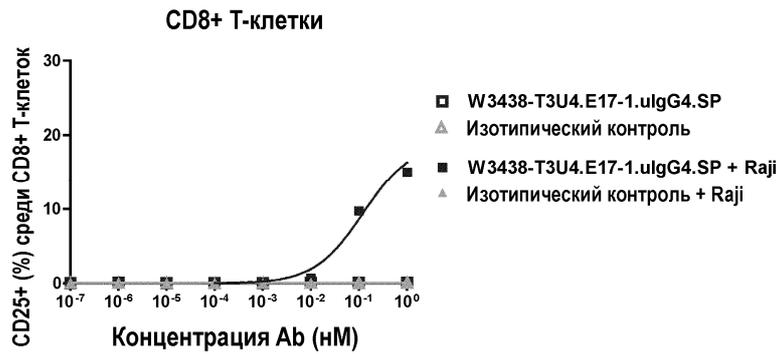
Фиг. 49А



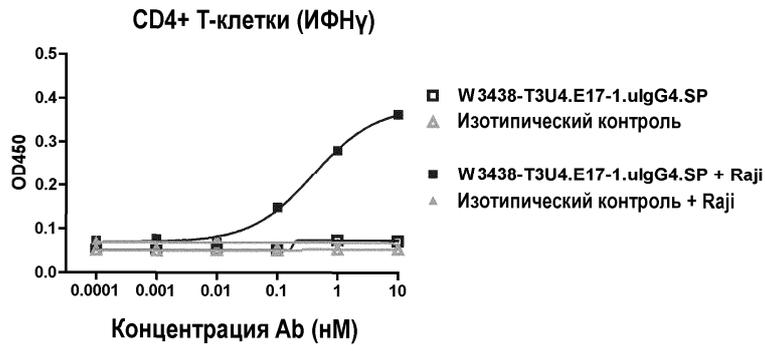
Фиг. 49В



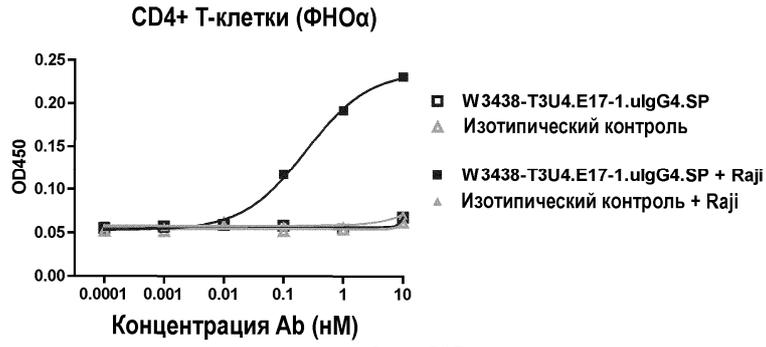
Фиг. 49С



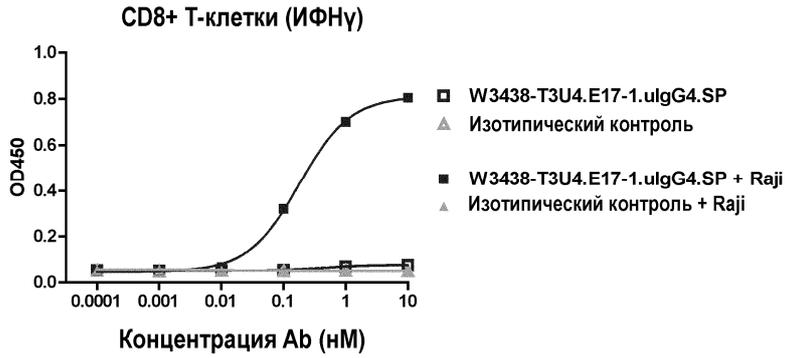
Фиг. 49D



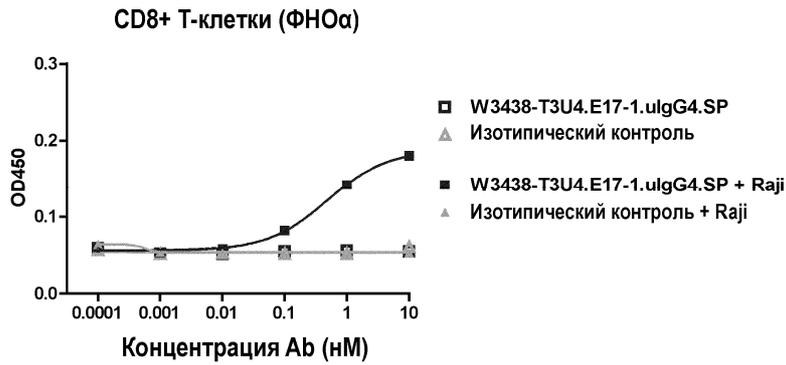
Фиг. 50А



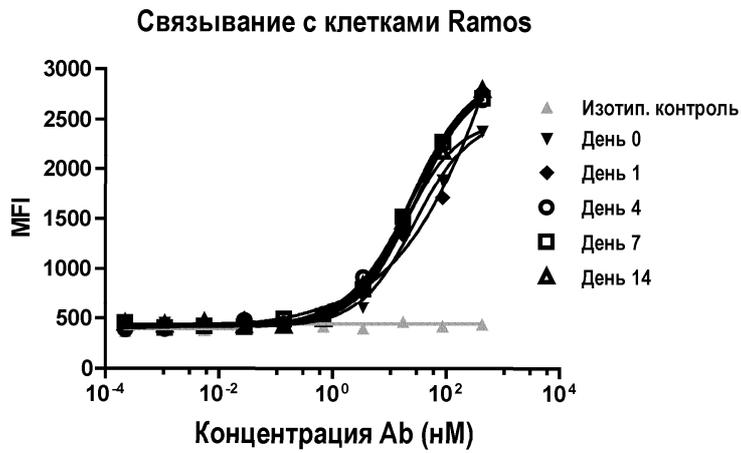
Фиг. 50B



Фиг. 50C

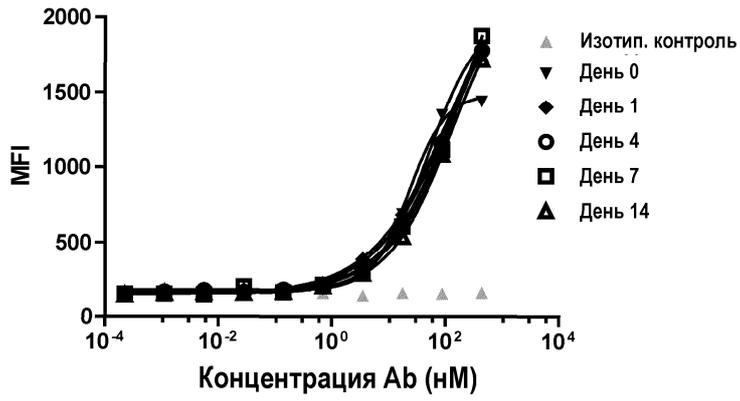


Фиг. 50D



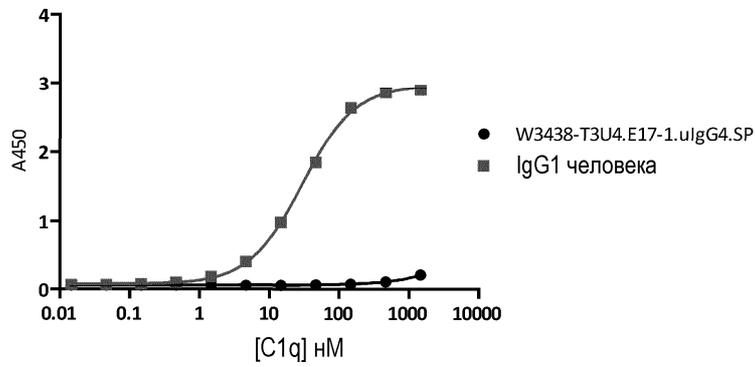
Фиг. 51A

Связывание с клетками Jurkat

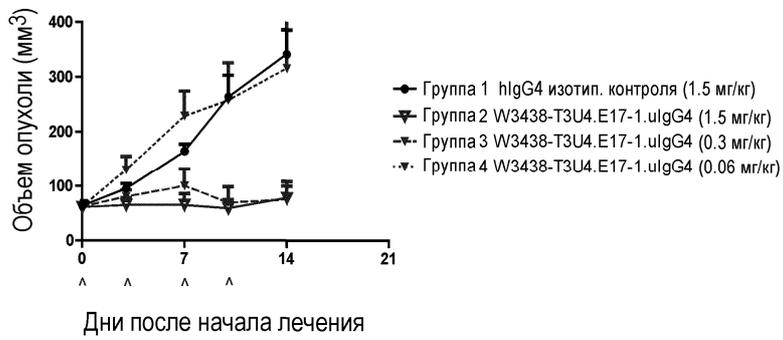


Фиг. 51В

Связывание с С1q человека

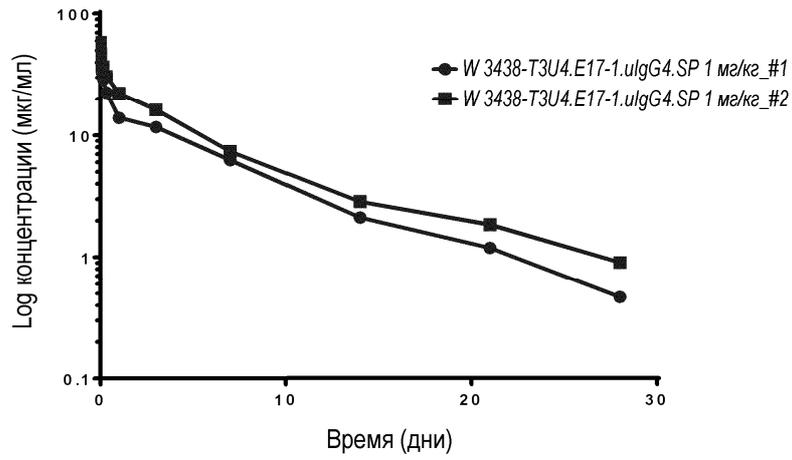


Фиг. 52

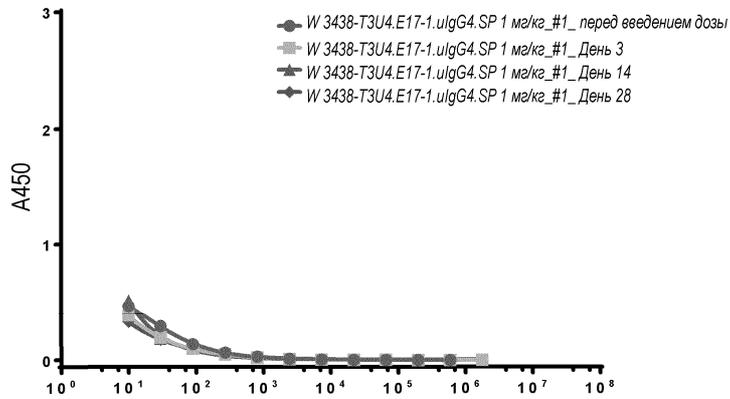


Фиг. 53

Концентрация антитела в сыворотке яванского макака в разные моменты времени

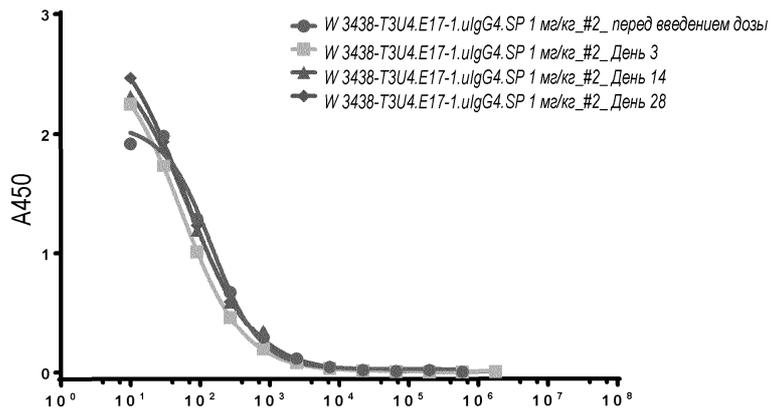


Фиг. 54



Коэффициент разбавления

Фиг. 55А

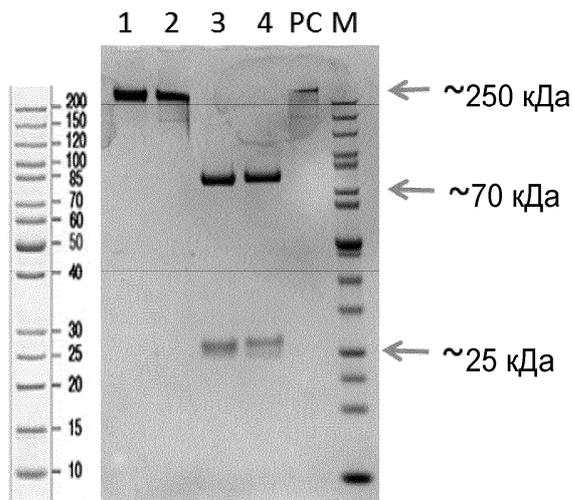


Коэффициент разбавления

Фиг. 55В

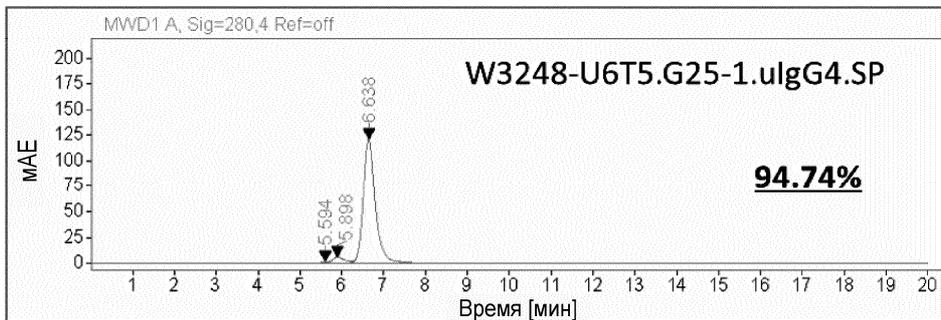
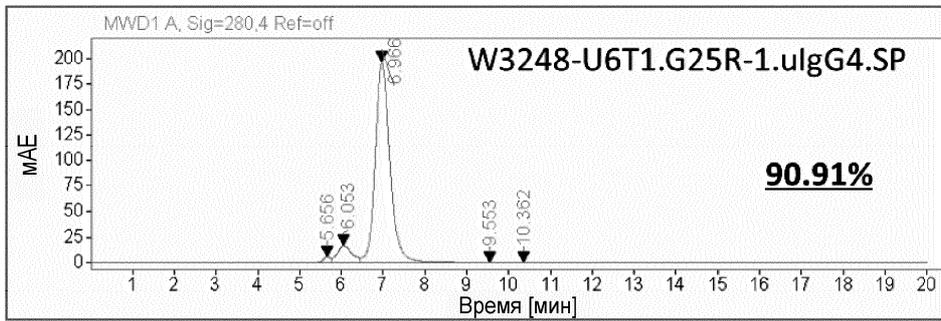
045653

Невосстановительные условия Восстановительные условия



Дорожка	Название белка	MW (кДа)
1	W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	242.7
2	W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	244.7
3	W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	22.5+76.6+22.2
4	W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	21.8+77.1+23.4
PC	ВМК	250
M	Неокрашенный белковый маркер PageRuler™	

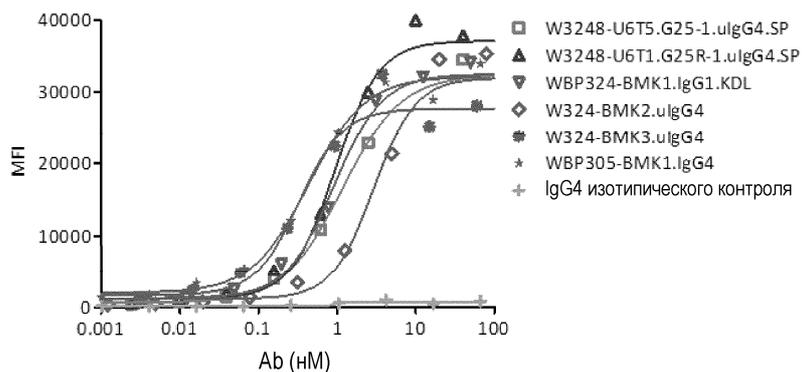
Фиг. 56А



Фиг. 56В

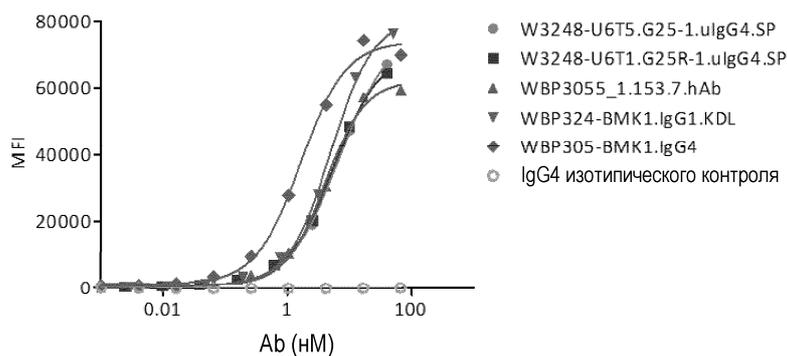
Антитело	Изотип	T _h 1(°С)	T _h 2(°С)
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	hIgG4, каппа	60.8	73.9
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	hIgG4, каппа	63.4	-
W324-BMK1.ulgG1.KDL	hIgG1, каппа	57.4	79.6

Фиг. 57



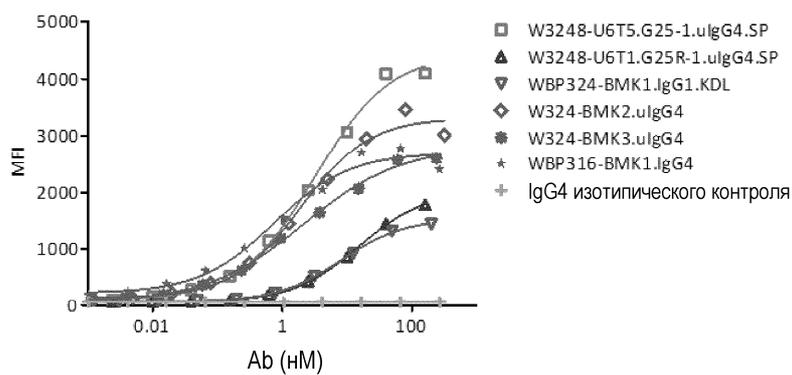
Антитело	EC ₅₀ (нМ)	MFI
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	1.176	32427
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	0.948	37076
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	0.9131	32468
W324-BMK2.ulgG4	2.943	31973
W324-BMK3.ulgG4	0.3317	27715
WBP305-BMK1.IgG4	0.3528	28771

Фиг. 58



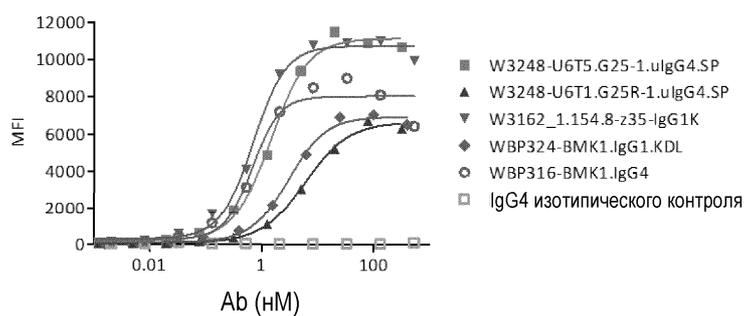
Антитело	EC ₅₀ (нМ)	Лучшие результаты (MFI)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	5.131	68107
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	4.709	66813
WBP3055_1.153.7.hAb	3.482	56664
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	4.661	78382
WBP305-BMK1.IgG4	1.435	69649

Фиг. 59



Антитело	EC ₅₀ (нМ)	MFI
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	3.173	4442
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	14.99	2021
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	7.977	1535
W324-BMK2.ulgG4	1.91	3322
W324-BMK3.ulgG4	2.114	2811
WBP316-BMK1.IgG4	0.7471	2699

Фиг. 60



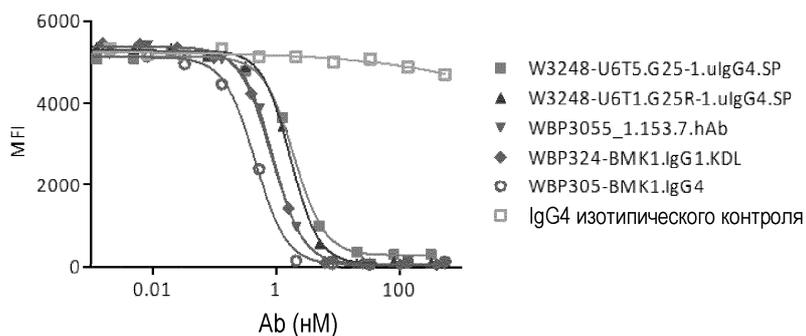
Антитело	EC ₅₀ (нМ)	Лучшие результаты (MFI)
W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	1.45	11156
W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	5.872	6653
W3162_1.154.8-z35-IgG1K	0.6994	10757
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	2.98	6951
WBP316-BMK1.IgG4	0.6737	8052

Фиг. 61

Аналит	Лиганд	ka (1/М*сек)	kd (1/сек)	KD (нМ)
CTLA4	W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	8.08E+05	2.88E-05	3.56E-11
	W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	1.83E+05	6.54E-05	3.57E-10
	WBP316-BMK1.ulgG4.SP	3.83E+05	4.97E-05	1.30E-10
PD-1	W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	5.42E+05	6.75E-04	1.24E-09
	W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	6.42E+05	8.44E-04	1.32E-09
	Родительское антитело	3.27E+05	6.14E-04	1.88E-09

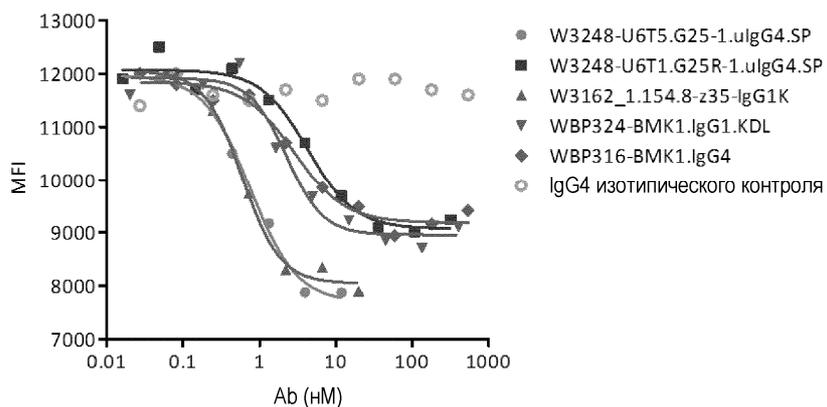
Фиг. 62

045653



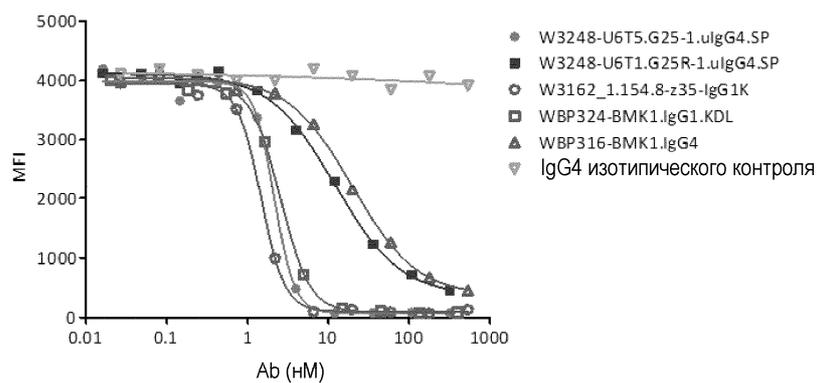
Антитело	IC ₅₀ (нМ)	% ингибирования
W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP	1.917	94.4
W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP	1.670	98.6
WBP3055_1.153.7.hAb	0.888	98.6
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	0.8308	99.4
WBP305-BMK1.IgG4	0.4536	99.1

Фиг. 63



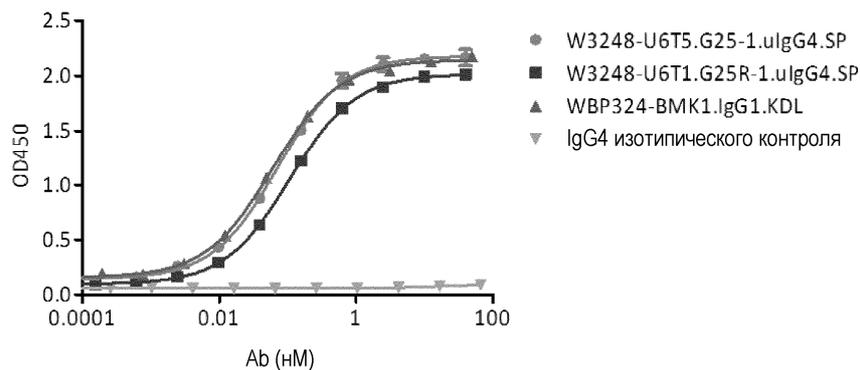
Антитело	IC ₅₀ (нМ)	% ингибирования
W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP	0.7581	35.9
W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP	4.300	24.4
W3162_1.154.8-z35-IgG1K	0.5935	32.9
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	2.267	25.3
WBP316-BMK1.IgG4	2.862	23.4

Фиг. 64



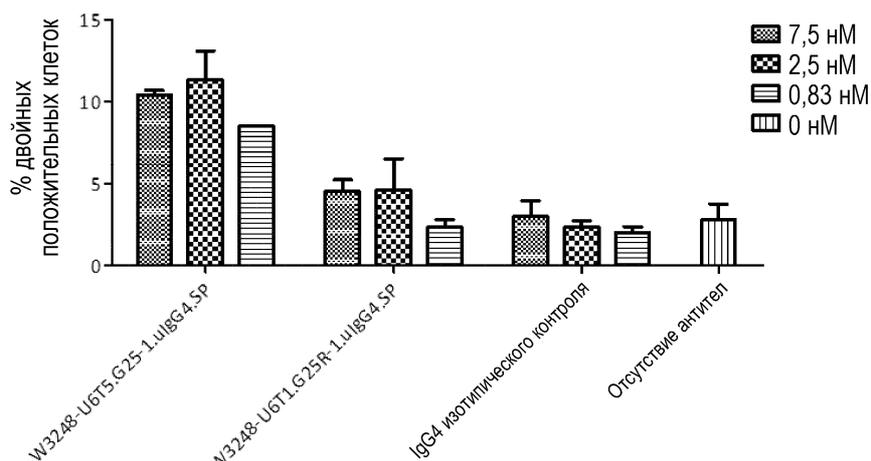
Антитело	IC ₅₀ (нМ)	% ингибирования
W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP	2.138	98.2
W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP	11.98	91.0
W3162_1.154.8-z35-IgG1K	1.468	97.6
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	2.553	97.9
WBP316-BMK1.IgG4	19.82	90.9

Фиг. 65

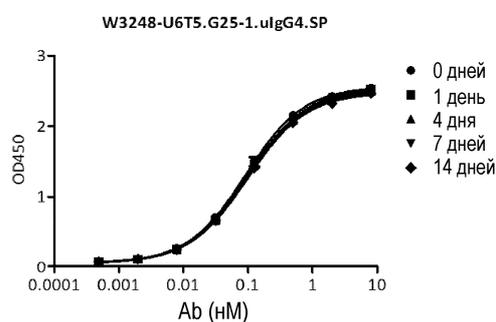


Антитело	EC ₅₀ (нМ)	Лучшие результаты (OD450)
W3248-U6T5.G25-1.uIgG4.SP	0.0710	2.178
W3248-U6T1.G25R-1.uIgG4.SP	0.1072	2.016
WBP324-BMK1.IgG1.KDL	0.0599	2.145

Фиг. 66

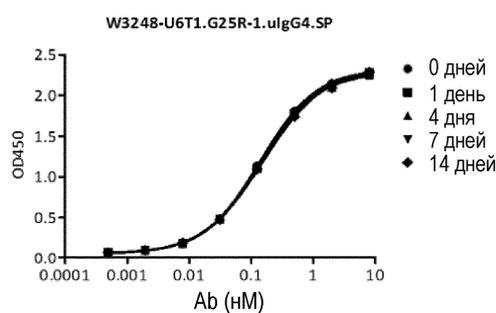


Фиг. 67



W3248-U6T5.G25-1.ulgG4.SP	EC ₅₀ (нМ)	Лучшие результаты (MFI)
0d	0.09203	2.559
1d	0.09778	2.541
4d	0.09443	2.516
7d	0.1014	2.502
14d	0.09894	2.482

Фиг. 68А



W3248-U6T1.G25R-1.ulgG4.SP	EC ₅₀ (нМ)	Лучшие результаты (MFI)
0d	0.14	2.328
1d	0.1475	2.318
4d	0.1406	2.286
7d	0.1446	2.285
14d	0.1561	2.333

Фиг. 68В

