

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391091** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.28

(22) Дата подачи заявки
2021.10.06

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К ДЕКТИНУ-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 63/088,895; 63/174,439

(32) 2020.10.07; 2021.04.13

(33) US

(86) PCT/US2021/071752

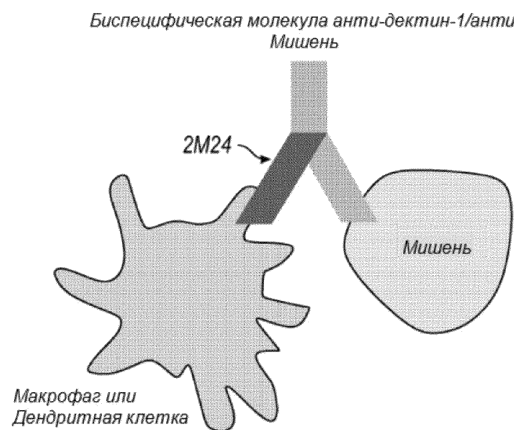
(87) WO 2022/077006 2022.04.14

(71) Заявитель:
ДРЕН БАЙО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Фотакис Панагиотис, А Ён-Чхапон
Эндрю П., Томасевич Ненад, Ши Жо
Ши, Дэн Сяоди (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к клону 2M24 (hfgG4) или 15E2 антитела к дектину-1 человека и содержащим их полиспецифическим связывающим молекулам, а также к способам их получения и применения.



A1

202391091

202391091

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577883EA/023

АНТИТЕЛА К ДЕКТИНУ-1 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[01] Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительным заявкам США с серийными номерами 63/088895, поданной 7 октября 2020 г., и 63/174439, поданной 13 апреля 2021 г., раскрытия каждой из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[02] Содержание поданного в текстовом файле ASCII полностью включено в данный документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 186542000440SEQLIST.TXT, дата записи: 6 октября 2021 г., размер: 108547 байт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[03] Настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают дектин-1 человека, полиспецифическим (*например*, биспецифическим) связывающим молекулам, а также к способам их применения и получения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[04] Фагоцитоз является основным механизмом, используемым для удаления патогенов и клеточного дебриса. Профессиональные фагоциты, такие как моноциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты, специфически распознают и поглощают хозяина или чужеродные агенты, которые являются аберрантными или вызывают заболевание. Поглощенный материал разрушается эндолизосомным путем в фагоцитах. Более того, дендритные клетки и макрофаги могут презентовать антигены клеткам адаптивной иммунной системы, чтобы дополнительно способствовать элиминации патогенных агентов.

[05] Дектин-1 представляет собой рецептор лектинов C-типа, который распознает бета-глюканы и способствует противогрибковой фагоцитарной активности. Он экспрессируется на фагоцитах, и было ясно показано, что его достаточно для активации фагоцитоза. Дектин-1 можно использовать для направленного антителами фагоцитоза и элиминации патогенных агентов.

[06] Было бы полезно разработать способы направленного удаления и деградации накопленных патогенных агентов без усиления общего фагоцитоза. Настоящее изобретение предлагает решение этих проблем и описывает другие преимущества.

[07] Все ссылки, цитируемые в данном документе, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, полностью включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[08] Настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают дектин-1

человека, полиспецифическим (*например*, биспецифическим) связывающим молекулам, а также к способам их применения и получения. В данном документе описаны способы направленного фагоцитоза для удаления патогенных агентов, включая клетки-хозяева/продукты клеток-хозяев, микробы или их продукты и т. д., при введении полиспецифических (*например*, биспецифических) связывающих молекул, содержащих плечо связывания дектина-1 и второе плечо, которое специфически связывается с агентом. Полиспецифические (*например*, биспецифические) связывающие молекулы позволяют фагоциту связываться с целевым агентом и образовывать синапс между ним и способствовать кластеризации дектина-1 на фагоците. Это стимулирует фагоцитоз целевого агента и в то же время секрецию цитокинов по пути дектин-1/Syk/NfκB фагоцитом. Более того, антигены из поглощенного материала презентированы на поверхности дендритных клеток/макрофагов, чтобы усилить адаптивный иммунный ответ против патогенного агента. В целом считается, что агонистические полиспецифические (*например*, биспецифические) связывающие дектин-1 молекулы способствуют иммунной стимуляции, направленному фагоцитозу и презентации неоантигена адаптивной иммунной системе/активации ее неоантигеном для элиминации патогенного агента.

[09] Таким образом, настоящее изобретение описывает, среди прочего, создание и функциональную характеристику агонистического антитела к дектину-1 человека, которое проявляет высокую аффинность связывания с дектином-1 и может способствовать иммунной стимуляции. Далее описано создание форматов биспецифических антител, включая антитело к дектину-1 человека с антителами, нацеленными на антигены патогенных агентов, с данными, подтверждающими взаимодействие с мишенью, иммунную стимуляцию, фагоцитоз и презентацию антигена.

[010] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, причем антитело или его фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH домен содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, причем антитело или его фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3 из

последовательности

домена

VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В

некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, причем антитело или его фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), при этом VH домен содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В

некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL включает последовательность DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, при этом антитело или его фрагмент связываются с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с EC50 менее 2 нМ, менее более 1 нМ или менее 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, при этом антитело или его фрагмент способны связывать дектин-1 человека или яванского макака. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, при этом антитело или его фрагмент не конкурируют (например, за связывание с дектином-1 человека) с нативным лигандом дектина-1, например, дектина-1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент конкурируют за связывание с дектином-1 человека с эталонным антителом, которое содержит: (а) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6); (б) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6); или (с) переменный домен тяжелой цепи (VH), включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), и переменный домен легкой цепи (VL), включающий последовательность DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с тем же эпитопом дектина-1 человека, что и эталонное антитело, которое содержит (а) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6); (б) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую

последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6); или (с) переменный домен тяжелой цепи (VH), включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), и переменный домен легкой цепи (VL), включающий последовательность DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляют собой человеческое, гуманизованное или химерное антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связываются с дектином-1 человека, экспрессированным на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки и/или гранулоцита. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечное антитело, наноантитело или scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит область Fc. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляют собой биспецифическое антитело, фрагмент или диатело, содержащее первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены VH и VL, которые связываются с человеческим дектином-1, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющей интерес мишенью или содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющей интерес мишенью, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий домены VH и VL, которые связываются с дектином-1 человека. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена в ассоциации с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, соединенную с доменом VH второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:24, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с Trop-2 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:42, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:43. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с амилоидом легкой цепи и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:44, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления первая область

Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или при этом вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замену T366W, а вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит первый линкер между доменами VH и VL и второй линкер между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит один или более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO:26). В некоторых вариантах осуществления первый линкер включает последовательность GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:27) или GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28). В некоторых вариантах осуществления второй линкер включает последовательность EPKRSDKTHTCPPC (SEQ ID NO:29) или SATHTCPPC (SEQ ID NO:30). В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, ковалентно связанное со вторым антителом IgG, содержащим второй антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замену T366W, а вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих впадины, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих выступы. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а вторая область Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, связанный с биотином или его авидинсвязывающим производным, и второе антитело IgG, содержащее второй антигенсвязывающий домен, связанный с авидином, стрептавидином, нейтравидином или его биотинсвязывающим производным, при этом биотин или его авидинсвязывающее производное связано с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их

биотинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, связанный с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, и второе антитело IgG, содержащее второй антигенсвязывающий домен, связанный с биотином, или его авидинсвязывающим производным, где биотин или его авидин-связывающее производное связано с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат (например, бета-амилоид или амилоид легкой цепи лямбда или каппа), частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой CD20; второй антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL); и домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA (SEQ ID NO:24) и/или домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVVRFSGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две тяжелые цепи антитела, при этом каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления каждая из тяжелых цепей антитела содержит замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две тяжелые цепи антитела, и только одна из тяжелых цепей антитела содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит два плеча, и только одно из плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены

S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит тяжелые цепи первого и второго антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH второй тяжелой цепи антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, и при этом тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелые цепи первого и второго антитела, при этом по меньшей мере одна или две из тяжелых цепей первого и второго антитела нефукозилированы. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть получено в линии клеток с нокаутом альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или альфа-1,3-маннозилгликопротеин-2-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (MGAT1). В некоторых вариантах осуществления антитело может продуцироваться в линии клеток, сверхэкспрессирующей β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В дополнительных вариантах осуществления линия клеток дополнительно сверхэкспрессирует μ -маннозидазу аппарата Гольджи II (ManII). В некоторых вариантах осуществления антитело может быть получено в линии клеток, обработанной ингибитором маннозидазы I, например, кифунензином.

[011] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена полиспецифическая связывающая молекула, содержащая: (a) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый антигенсвязывающий домен, где первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека; и (b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее второй антигенсвязывающий домен, где второй антигенсвязывающий домен связывается с представляющей интерес мишенью. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат (например, бета-амилоид или амилоид легкой цепи лямбда или каппа), частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку LC2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки LC2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В

некоторых вариантах осуществления представляющая мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTVSSLPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTVSSLPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTVSSLPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен: связывается с

дектином-1 человека, экспрессированным на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита; связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с EC50 менее 2 нМ; способен связывать дектин-1 человека или яванского макака; и/или не конкурирует с нативным лигандом дектина-1 человека. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:24, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с Trop-2 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:42, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:43. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с амилоидом легкой цепи и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:44, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой человеческие или гуманизированные антитела или фрагменты. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, наноантитела или фрагменты scFv. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов дополнительно содержат домен Fc. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент Fab представляет собой фрагмент, а второе антитело или его фрагмент представляет собой полноразмерное антитело, например, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое и второе антитела или их фрагменты являются полноразмерными антителами, например, каждое из которых включает тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена в ассоциации с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, соединенную с доменом VH второго антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или при этом вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замену T366W, а вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит первый линкер между доменами VH и VL и второй линкер между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления

первый линкер содержит один или более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO:26). В некоторых вариантах осуществления первый линкер включает последовательность GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:27) или GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28). В некоторых вариантах осуществления второй линкер включает последовательность EPKRSDKTHTCPPC (SEQ ID NO:29) или SATHTCPPC (SEQ ID NO:30). В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; или при этом второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; и при этом первое антитело или его фрагмент связаны со вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным и биотином или его авидинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело или его фрагмент представляют собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело, связанное с мономерным стрептавидином (mSA), а второе антитело или его фрагмент представляют собой биотинилированное полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, ковалентно связанное со вторым антителом IgG, содержащим второй антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и легкую цепь первого антитела, содержащую домен VL первого антигенсвязывающего домена, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена, и вторую область Fc, и легкую цепь второго антитела, содержащую домен VL второго антигенсвязывающего домена, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замену T366W, и при этом вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее домен VH второго антигенсвязывающего домена

и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих впадины, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих выступы. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, и при этом вторая область Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит две области Fc антитела, при этом каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления каждая из областей Fc антитела содержит замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит две тяжелые цепи антитела, и только одна из тяжелых цепей антитела содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления только одно из плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела, а также тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует первый антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH тяжелой цепи второго антитела образует второй антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, а тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела являются нефукозилированными. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть получено в линии клеток с нокаутом альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или альфа-1,3-маннозилгликопротеин-2-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (MGAT1). В некоторых вариантах осуществления антитело может продуцироваться в линии клеток, сверхэкспрессирующей β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В дополнительных вариантах осуществления линия клеток дополнительно сверхэкспрессирует μ -маннозидазу аппарата Гольджи II (ManII). В некоторых вариантах осуществления антитело может быть получено в линии клеток, обработанной ингибитором маннозидазы I, например, кифунензином.

[012] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена полиспецифическая связывающая молекула, содержащая: (a) первое антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с первой представляющей интерес мишенью; и (b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается со второй представляющей интерес мишенью; при этом: (i) первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; или (ii) второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; и при этом первое антитело или его фрагмент связаны со вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным и биотином или его авидинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах реализации первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых

вариантах осуществления домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTGLVTV
SS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В

некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTGLVTV SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В

некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первую полипептидную цепь, включающую

последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTGLVTV

SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTF
GPGTKVDIEEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31), вторую полипептидную цепь, включающую последовательность

QVQLQPPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAG
TTVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF

PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32), и третью

полипептидную цепь, включающую последовательность QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVVPRF SGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLK KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33). В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первое плечо, содержащее первый антигенсвязывающий домен, и второе плечо, содержащее второй антигенсвязывающий домен; при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека, а второй антигенсвязывающий домен связывается с представляющей интерес мишенью; и при этом первое плечо содержит полипептидную цепь, включающую последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGQGLTVTV SSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQ QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой человеческие или гуманизированные антитела или фрагменты. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, наноантитела или фрагменты scFv. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов дополнительно содержат домен Fc. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, и при этом второе антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело, связанное с мономерным стрептавидином (mSA), а второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой

бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат (например, бета-амилоид или амилоид легкой цепи лямбда или каппа), частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой CD20; второй антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL); и домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSA (SEQ ID NO:24) и/или домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVQKPGSSPKPWYATSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с TROP-2 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:42, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:43. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с амилоидом легкой цепи и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:44, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:45.

[013] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен полинуклеотид, кодирующий антитело или полиспецифическую связывающую молекулу в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен вектор (например, вектор экспрессии), содержащий полинуклеотид по любому из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка-хозяин (например, выделенная клетка-хозяин или линия клеток), содержащая полинуклеотид или вектор в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ получения антитела или полиспецифической связывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления в условиях, подходящих для продукции антитела или

полиспецифической связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение антитела или полиспецифической связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или полиспецифическую связывающую молекулу в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

[014] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ создания полиспецифической связывающей молекулы, включающий: (a) получение первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с первой представляющей интерес мишенью; (b) обеспечение второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается со второй представляющей интерес мишенью; причем: (i) первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; или (ii) второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; и (c) приведение в контакт первого антитела или его фрагмента со вторым антителом или его фрагментом в условиях, подходящих для связывания между первым антителом или его фрагментом и вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, и биотином или его авидинсвязывающим производным, в результате чего образуется полиспецифическая связывающая молекула. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ идентификации полиспецифической связывающей молекулы, которая связывает первую и вторую представляющие интерес мишени, включающий: (a) получение первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с первой представляющей интерес мишенью; (b) обеспечение второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается со второй представляющей интерес мишенью; причем: (i) первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; или (ii) второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным; (c) приведение в контакт первого антитела или его фрагмента со вторым

антителом или его фрагментом в условиях, подходящих для связывания между первым антителом или его фрагментом и вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, и биотином или его авидинсвязывающим производным, в результате чего образуется полиспецифическая связывающая молекула; и (d) измерение связывания между полиспецифической связывающей молекулой и по меньшей мере одной из первой и второй представляющих интерес мишеней. В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах реализации первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGTLLVTV

SS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

В некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой человеческие или гуманизированные антитела или фрагменты. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, наноантитела или фрагменты scFv. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов дополнительно содержат домен Fc. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент Fab представляет собой фрагмент, а второе антитело или его фрагмент представляет собой полноразмерное антитело, например, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое и второе антитела или их фрагменты являются полноразмерными антителами, например, каждое из которых включает тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело, связанное с мономерным стрептавидином (mSA), а второе антитело или его фрагмент представляют собой биотинилированное полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат (например, бета-амилоид или амилоид легкой цепи лямбда или каппа), частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень

представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой CD20, второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL); и домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSA (SEQ ID NO:24) и/или домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две области Fc антитела, при этом каждая из областей Fc антитела содержит аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления каждая из тяжелых цепей антитела содержит замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две тяжелые цепи антитела, и только одна из тяжелых цепей антитела содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления только одно из плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH второй тяжелой цепи антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, и при этом тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела являются

нефукозилированными. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть получено в линии клеток с нокаутом альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или альфа-1,3-маннозилгликопротеин-2-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (MGAT1). В некоторых вариантах осуществления антитело может продуцироваться в линии клеток, сверхэкспрессирующей β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В дополнительных вариантах осуществления линия клеток дополнительно сверхэкспрессирует μ -маннозидазу аппарата Гольджи II (ManII). В некоторых вариантах осуществления антитело может быть получено в линии клеток, обработанной ингибитором маннозидазы I, например, кифунензином.

[015] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение эффективного количества антитела, полиспецифической связывающей молекулы или композиции в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления нуждающемуся в этом индивиду. В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека, а вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат (например, бета-амилоид или амилоид легкой цепи лямбда или каппа), частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку IL2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки IL2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, вирусную инфекцию, мастоцитоз или болезнь тучных клеток, системный мастоцитоз, амилоидоз (например, амилоидоз легких цепей или болезнь Альцгеймера) или связанное со старением заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления представляющая мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. В некоторых вариантах осуществления индивид является человеком.

[016] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей полиспецифическую связывающую молекулу, нуждающемуся в этом индивиду, причем полиспецифическая связывающая молекула содержит: (a) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека; и (b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие второй антигенсвязывающий домен, при этом второй

антигенсвязывающий домен связывается с CD70, HER2, DLL3, нектином-4, TROP-2, мезотелином, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с CD70 человека, HER2 человека, DLL3 человека, нектином-4 человека, TROP-2 человека, мезотелином человека, LIV-1 человека, C-MET человека, FOLR1 человека, CD20 человека, CCR8, CD33 человека или EGFR человека, например, экспрессированными на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTLVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах реализации первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В

некоторых вариантах осуществления домен VH первого антигенсвязывающего домена включает последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL первого антигенсвязывающего домена

включает последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В

некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20; при этом второй антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность

QVQLQPPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSA (SEQ ID NO:24) и/или при этом домен VL второго антигенсвязывающего

домена включает последовательность

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVQKPGSSPKPWYATSNLASGVVPRF
SGSGSGTSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25). В

некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее первый антигенсвязывающий домен и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее второй антигенсвязывающий домен и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замену T366W, а вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее первый антигенсвязывающий домен и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее второй антигенсвязывающий домен и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих впадины, и вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих выступы. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, а вторая область Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две области Fc антитела, при этом каждая из

областей Fc антитела содержит аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления каждая из тяжелых цепей антитела содержит замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две тяжелые цепи антитела, и только одна из тяжелых цепей антитела содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления только одно из плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH второй тяжелой цепи антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, и при этом тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления (например, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20) антитело содержит три полипептидные цепи: первую полипептидную цепь, включающую последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGGTLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31), вторую полипептидную цепь, включающую последовательность
 QVQLQPPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD
 TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAG
 TTVTVAASSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 VSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32), и третью

полипептидную цепь, включающую последовательность
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVVPRF
 SGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLS
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33). В некоторых
 вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела являются
 нефукозилированными. В некоторых вариантах осуществления антитело может быть
 получено в линии клеток с нокаутом альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или альфа-1,3-
 маннозилгликопротеин-2-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (MGAT1). В
 некоторых вариантах осуществления антитело может продуцироваться в линии клеток,
 сверхэкспрессирующей β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III). В
 дополнительных вариантах осуществления линия клеток дополнительно
 сверхэкспрессирует μ -маннозидазу аппарата Гольджи II (ManII). В некоторых вариантах
 осуществления антитело может быть получено в линии клеток, обработанной
 ингибитором маннозидазы I, например, кифунензином. В некоторых вариантах
 осуществления индивид является человеком.

[017] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен набор
 или промышленное изделие, содержащее антитело, полиспецифическую связывающую
 молекулу или композицию в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов
 осуществления, и инструкции по применению антитела, полиспецифической
 связывающей молекулы или композиции в соответствии со способом любого из
 вышеприведенных вариантов осуществления.

[018] Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных
 вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть объединены для
 формирования других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие
 аспекты настоящего изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники.
 Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно описаны в
 подробном описании, которое следует ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[019] На **Фиг. 1A-1C** показан анализ связывания антитела к дектину-1 человека
 (клон 2M24) с использованием моноцитов человека и обезьяны, полученных из
 мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), с помощью проточной
 цитометрии. Одиночные, живые и CD14+ клетки гейтировали для идентификации
 моноцитов. Клетки инкубировали с первичным антителом к дектину-1 2M24 или
 антителом изотипического контроля mIgG1 с последующей инкубацией с
 флуоресцентным антимышиным вторичным антителом. Первичные антитела
 использовали при серийном титровании дозы. На **Фиг. 1A** показан анализ связывания
 клона 2M24 к человеческому дектину-1 с моноцитами человека. На **Фиг. 1B** показан
 анализ связывания клона антитела к человеческому дектину-1 2M24 с моноцитами
 яванского макака. На **Фиг. 1C** показано сравнение связывания с моноцитами человека,

клетками НЕК, сверхэкспрессирующими дектин-1 человека, и моноцитами яванского макака для клона 2M24 и других антител к дектину-1, идентифицированными в результате иммунизации трансгенных мышей АТХ-Gx от Alloy, а также коммерческих антител к дектину-1. Клон антитела к человеческому дектину-1 2M24 продемонстрировал высокую аффинность к дектину-1 как человека, так и яванского макака, экспрессированному в моноцитах, и показал более высокую аффинность по сравнению с другими антителами к дектину-1, включая коммерческие антитела.

[020] **На Фиг. 2А-2В** показан фагоцитоз меченных pHrodo полистироловых частиц с антителом к Fc IgG мыши, конъюгированных с антителом к дектину-1 2M24 или изотипическим контрольным антителом, клетками НЕК-Blue hDectin-1a и моноцитами человека. Полистироловые частицы с антителом к IgG к Fc мыши (~ 3,4 мкм) метили pH-чувствительным флуоресцентным красителем (pHrodo Red) и конъюгировали с антителом к дектину-1 2M24 или изотипическим контролем. Затем частицы инкубировали с культивируемыми клетками НЕК-Blue hDectin-1a или моноцитами человека в соотношении 1:2 (клетки: частицы). Клетки НЕК-Blue hDectin-1a метили проникающим в клетки красителем кальцеином-АМ. Фагоцитоз частиц контролировали с помощью визуализации живых клеток IncuCyte. Фагоцитоз определяли количественно с использованием программного обеспечения для анализа IncuCyte и выражали как перекрытие количества красных объектов (pHrodo) с кальцеин-положительными клетками. **На Фиг. 2А** показан фагоцитоз частиц в течение 2,5 часов в клетках НЕК-Blue hDectin-1a (вверху) и репрезентативные изображения pHrodo-положительных клеток через 2,5 часа фагоцитоза (внизу). **На Фиг. 2В** показан фагоцитоз частиц моноцитами человека в течение 4 часов (вверху), а также репрезентативные изображения pHrodo-положительных клеток через 2,5 часа фагоцитоза (внизу). На репрезентативных изображениях поглощенные частицы ярко флуоресцируют в фагосомах.

[021] **На Фиг. 3А-3В** показано связывание полностью человеческого антитела к дектину-1 2M24 (hIgG4) или изотипического контрольного антитела с клетками НЕК-Blue hDectin-1a и первичными человеческими моноцитами. **На Фиг. 3А** показан анализ связывания полностью человеческого антитела к дектину-1 2M24 с клетками НЕК, а на **Фиг. 3В** показано связывание с первичными моноцитами человека. Первичные антитела использовали для серийного титрования дозы с последующим флуоресцентным вторичным антителом против первичного антитела. Полностью человеческое антитело hIgG4 к дектину-1 2M24 связывалось с высокой аффинностью с клетками, экспрессирующими дектин-1.

[022] **На Фиг. 4** показан направленный фагоцитоз меченных pHrodo полистироловых частиц с биотином, конъюгированных с полностью человеческим антителом к дектину-1 2M24 (hIgG4) или изотипическим контрольным антителом клетками, экспрессирующими дектин-1. Полистироловые частицы с биотином метили pHrodo Red и конъюгировали через стрептавидин с антителом к дектину-1 2M24 или изотипическим контролем. Конъюгированные частицы смешивали с клетками в

соотношении 1:3, и фагоцитоз частиц контролировали с помощью визуализации живых клеток IncuCyte. Фагоцитоз частиц с phrodo-биотином, конъюгированных через стрептавидин с антителом hIgG4 к дектину-1 2M24, показан для клеток НЕК-Blue hDectin-1a (вверху слева), моноцитов человека (вверху справа) и макрофагов человека (внизу). Полностью человеческое антитело к дектину-1 2M24 (hIgG4) стимулировало фагоцитоз в клетках, экспрессирующих дектин-1.

[023] На **Фиг. 5А-5В** показаны результаты репортерного анализа секретируемой щелочной фосфатазы для дектина-1 в клетках НЕК-Blue hDectin-1a. На **Фиг. 5А** показаны результаты анализа секретируемой щелочной фосфатазы, проведенного с использованием иммобилизованного полностью человеческого антитела к дектину-1 2M24. Полностью человеческое антитело к дектину-1 2M24 (hIgG4) или изотипическое контрольное антитело иммобилизовали в течение ночи в полипропиленовых титрационных микропланшетах с U-образным дном в количествах от 0,1 до 10 мкг на лунку с последующим культивированием клеток НЕК-Blue hDectin-1a в течение 22 часов и определение секреции щелочной фосфатазы при ОП 630 нм в супернатанте. На **Фиг. 5В** показаны результаты анализа секретируемой щелочной фосфатазы, проведенного с использованием конъюгированных с частицами полностью человеческого антитела к дектину-1 2M24. Частицы с биотином размером 3, 10 и 16,5 мкм конъюгировали через стрептавидин с антителом к дектину-1 2M24 (hIgG4). Частицы, конъюгированные с антителами, смешивали с клетками НЕК-Blue hDectin-1a в течение 22 часов и супернатант оценивали на секрецию щелочной фосфатазы при ОП 630 нм. Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. Антитело к дектину-1 2M24 (hIgG4) индуцировало секрецию щелочной фосфатазы в клетках НЕК-Blue hDectin-1a как в иммобилизованной форме, так и в конъюгированной с частицами форме.

[024] На **Фиг. 6А-6В** показана секреция цитокинов первичными макрофагами человека, стимулированными антителом к дектину-1 (15E2) в растворе. Первичные макрофаги человека и первичные моноциты стимулировали 10 мкг/мл антитела к дектину-1 15E2 или изотипического антитела в растворе в течение 24 часов, и секрецию TNF α и IL6 оценивали с помощью анализа супернатанта на основе ELISA. Зимозан использовали в качестве положительного контроля в отношении секреции цитокинов. Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. На **Фиг. 6А** показаны результаты для первичных моноцитов человека, стимулированных растворимым антителом к дектину-1 15E2, тогда как на **Фиг. 6В** показаны результаты для стимулированных первичных макрофагов человека. Растворимое антитело к дектину-1 15E2 не индуцировало секрецию цитокинов в первичных моноцитах и макрофагах человека.

[025] На **Фиг. 7А-7В** показана секреция цитокинов первичными моноцитами и РВМС человека, стимулированными иммобилизованными антителами к дектину-1 2М24 или 15Е2. Антитела к дектину-1 или антитела изотипического контроля иммобилизовали в течение ночи в полипропиленовых титрационных микропланшетах с U-образным дном по 10 мкг на лунку с последующим культивированием моноцитов человека или РВМС человека в течение 24 часов. Секрецию TNF α , IL6 и IFN γ оценивали с помощью анализа супернатанта на основе ИФА. На **Фиг. 7А** показана секреция цитокинов моноцитами человека после стимуляции иммобилизованными антителами к дектину-1, а на **Фиг. 7В** показана секреция цитокинов культивируемыми РВМС человека после стимуляции. Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. Антитело к дектину-1 2М24 индуцировало секрецию цитокинов как в первичных моноцитах человека, так и в РВМС и демонстрировало более сильную иммунную стимуляцию по сравнению с агонистическим антителом к дектину-1 15Е2

[026] На **Фиг. 8** показаны результаты конкурентного анализа, проведенного с использованием клона антитела к дектину-1 12М4 и природных лигандов дектина-1. Клетки НЕК-Blue hDectin-1a инкубировали в 1/3 серийном титровании дозы антитела к дектину-1 2М24 (hIgG4) или коммерческих антител к дектину-1 15Е2, 259931, GE2, начиная с 300 нМ и в присутствии 8 мкг/мл биотин-ламинарина в течение 30 минут на льду. Связывание ламинарина с дектином-1 оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием стрептавидина-Alexa fluor 647. Антитело к дектину-1 2М24 (hIgG4) не конкурировало с природным лигандом за связывание с дектином-1.

[027] На **Фиг. 9** представлена сводка функциональных характеристик антител к дектину-1 2М24 и 15Е2.

[028] На **Фиг. 10А-10В** показана схематическая иллюстрация образования биспецифических антител с помощью клик-химии. На **Фиг. 10А** показано дифференциальное мечение антител реагентами МТА или FOL. На **Фиг. 10В** изображено ковалентное сшивание антител посредством специфических взаимодействий МТА-FOL.

[029] На **Фиг. 11А** показаны возможные формы активности, применяемые агонистическими биспецифическими антителами к дектину-1 для элиминации раковых клеток-мишеней. К ним относятся иммунная стимуляция, фагоцитоз, презентация неоантигенов и активация Т- и В-лимфоцитов адаптивной иммунной системы.

[030] На **Фиг. 11В** приведен перечень потенциальных мишеней для истощения раковых клеток.

[031] На **Фиг. 12А-12В** показана характеристика биспецифических молекул, конъюгированных с помощью клик-химии, содержащих плечи к дектину-1 (клон 2М24) и к hCD70. На **Фиг. 12А** показан анализ методом ДСН-ПААГ-электрофореза пар ковалентно конъюгированных антител (2М24/анти-hCD20, 2М24/анти-hCD70 и изотипические контроли) в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. На

Фиг. 12В показана основанная на проточной цитометрии характеристика связывания биспецифической молекулы (2М24/анти-hCD70 или изотипическим контролем) с клетками НЕК293, экспрессирующими дектин-1, (вверху слева), и двумя линиями клеток почечной карциномы - А498 (вверху справа) и 786-0 (снизу слева). На **Фиг. 12В** также показана концентрация ЕС50 (нМ) на основе нелинейной регрессионной аппроксимации (внизу справа). Биспецифическое антитело к дектину-1/hCD70 связывается с клетками, экспрессирующим дектин-1 или CD70, с аффинностью 1,8 нМ или 12,34 нМ, соответственно.

[032] На **Фиг. 13** показано связывание линии клеток НЕК293, экспрессирующей дектин-1, и линии клеток почечной карциномы А498, индуцированное биспецифической молекулой 2М24/анти-hCD70. Показан анализ совместных культур клеток НЕК293 (помеченных кальцеином зеленым) и клеток А498 (помеченных кальцеином красным) в присутствии биспецифической молекулы 2М24/анти-hCD70 или изотипического контроля (слева) методом проточной цитометрии. Связывание клеток НЕК293 и А498 обозначено двойным положительным сигналом (зеленый+красный +, квадратная рамка). Также показана эффективность связывания, которая количественно определяется как процент от общего числа клеток-мишеней (А498), которые образуют дублеты с клетками НЕК293 (справа). Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=3 повторности. Биспецифическое антитело 2М24/анти-hCD70 индуцировало связывание линии клеток НЕК293, экспрессирующей дектин-1, и линии клеток почечной карциномы А498

[033] На **Фиг. 14А-14В** показано связывание клеток, экспрессирующих дектин-1, и В-клеток, индуцированное биспецифическим антителом к дектину-1/hCD20. На **Фиг. 14А** показано связывание клеток НЕК293, экспрессирующих дектин-1, и В-клеток, индуцированное биспецифическим антителом к дектину-1/hCD20. Показан анализ совместных культур клеток НЕК293 (помеченных кальцеином зеленым) и клеток Raji (помеченных кальцеином красным) в присутствии биспецифической молекулы 2М24/анти-hCD70 или изотипического контроля (слева) методом проточной цитометрии. Связывание клеток НЕК293 и Raji обозначено двойным положительным сигналом (зеленый+красный +; квадратная рамка). Также показана эффективность В связывания, которая количественно определяется как процент от общего числа клеток-мишеней (Raji), которые образуют дублеты с клетками НЕК293 (справа). Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. На **Фиг. 14В** показаны результаты аналогичных экспериментов, проведенных для оценки связывания макрофагов М0 человека и клеток Raji, индуцированного биспецифической молекулой к дектину-1/hCD20. Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2

повторности. Биспецифическая молекула 2M24/анти-hCD20 индуцировала связывание клеток, экспрессирующих дектин-1, и CDC20-положительных В-клеток (клеток Raji).

[034] На **Фиг. 15** показаны результаты анализа секретируемого репортера щелочной фосфатазы с помощью дектина-1 в клетках HEK-Blue hDectin-1a с использованием биспецифической молекулы к дектину-1/CD20 в присутствии клеток Raji. Биспецифическое антитело 2M24 (hIgG4)/анти-CD20 инкубировали с клетками Raji, после чего его дважды промывали для удаления несвязавшегося биспецифического антитела. Затем клетки Raji смешивали с клетками HEK-Blue hDectin-1a в соотношении 200000 клеток Raji на 100000 клеток HEK в течение 22 часов. Секретируемую щелочную фосфатазу оценивали при ОП 630 нм в супернатанте. Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. Клетки Raji, покрытые биспецифической молекулой к дектину-1/CD20, индуцировали секрецию щелочной фосфатазы в клетках HEK-Blue hDectin-1a.

[035] На **Фиг. 16** показана индукция фагоцитоза клеток Raji клетками HEK 293, экспрессирующими дектин-1, биспецифическими антителами к дектину-1/hCD20. Показаны репрезентативные изображения Incucyte, иллюстрирующие фагоцитоз клеток Raji клетками HEK (стрелка) через 16 часов по сравнению с 0 часами (слева). На совместную локализацию указывает желтая флуоресценция. Снижение сигнала кальцеина красного для клеток Raji через 16 ч указывает на гибель клеток, опосредованную фагоцитозом. Показана количественная оценка перекрытия или совместной локализации HEK (кальцеин зеленый) и Raji (кальцеин красный) в разных группах лечения (справа). Предварительная инкубация клеток HEK с ингибитором АЗКФ латрункулином А блокирует фагоцитоз, опосредованный биспецифическим антителом 15E2/анти-hCD20. (n=2 повторности).

[036] На **Фиг. 17** показано связывание клеток, экспрессирующих дектин-1 и HER2, индуцированное биспецифическими антителами к дектину-1/hHER2. Показан анализ совместных культур клеток HEK 293, экспрессирующих дектин-1 (помеченных кальцеином зеленым), и клеток SKBR3, экспрессирующих HER2, (помеченных pHrodo red), в присутствии биспецифического антитела 15E2/анти-hHER2 или изотипического контроля (левый) методом проточной цитометрии. Связывание клеток HEK 293 и SKBR3 обозначено двойным положительным сигналом (зеленый+красный +; квадратная рамка). Также показана эффективность В связывания, которая количественно определяется как процент от общего числа клеток-мишеней (SKBR3), которые образуют дублеты с клетками, экспрессирующими дектин-1, (справа). Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. Биспецифическая молекула к дектину-1/hHER2 индуцирует связывание дектин-1- и HER2-положительных раковых

клеток.

[037] На **Фиг. 18** показано связывание клеток НЕК293, экспрессирующих дектин-1, и клеток ВаF3, экспрессирующих CD94, индуцированное биспецифической молекулой к дектину-1/hCD94. Показан анализ совместных культур клеток НЕК293 (помеченных кальцеином зеленым) и клеток ВаF3 (помеченных pHrodo red) в присутствии биспецифической молекулы 2M24/анти-hCD94 или изотипического контроля (слева) методом проточной цитометрии. Связывание клеток НЕК293 и ВаF3 обозначено двойным положительным сигналом (зеленый+ красный+; квадратная рамка). Также показана эффективность В связывания, которая количественно определяется как процент от общего числа клеток-мишеней (ВаF3), которые образуют дуплеты с клетками НЕК293 (справа). Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=2 повторности. Биспецифическая молекула к дектину-1/hCD94 индуцировала связывание дектин-1- и CD94-экспрессирующих клеток.

[038] На **Фиг. 19А-19В** показано схематическое изображение Fab 2M24-mSA или полноразмерного 2M24-mSA, связанного с биотинилированным антителом-мишенью. На **Фиг. 19А** показаны химерные белки мономерного стрептавидина (mSA) и Fab 2M24 или полноразмерного 2M24. mSA генетически слит либо с Fab 2M24, либо с полноразмерным 2M24. На **Фиг. 19В** показано связывание Fab 2M24-mSA или 2M24-mSA с биотинилированными антителами-мишенями. Химерные белки инкубируют с биотинилированными антителами-мишенями для получения биспецифических молекул, содержащих плечо, связывающее Дектин-1, и второе плечо, связывающее представляющий интерес целевой рецептор или белок.

[039] На **Фиг. 20А-20С** показаны биохимические и функциональные характеристики слитого белка Fab 2M24-mSA. На **Фиг. 20А** показана характеристика рекомбинантного Fab 2M24-mSA методом ВЭЖХ. На **Фиг. 20В** показан анализ очищенного Fab 2M24-mSA методом ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях. На **Фиг. 20С** показана характеристика связывания Fab 2M24-mSA с клетками НЕК 293, стабильно сверхэкспрессирующими дектин-1 человека, ($EC_{50}=1,45$ нМ) методом проточной цитометрии. Fab 2M24, слитый с мономерным стрептавидином, связывается с клетками, экспрессирующими дектин-1, с аффинностью 1,45 нМ.

[040] На **Фиг. 21А-21В** показан фагоцитоз меченных pHrodo полистироловых частиц с биотином, конъюгированных с меченным мономерным стрептавидином антителом Fab-2M24 к дектину-1 (Fab-2M24-mSA). На **Фиг. 21А** показано образование дуплетов клеток НЕК-Blue hDectin-1a с Fab-2M24-mSA, конъюгированных с частицами с биотином, и фагоцитоз частиц, оцененный с помощью проточной цитометрии. На **Фиг. 21В** показан фагоцитоз частиц с pHrodo-биотином (~ 3 мкм), конъюгированных с Fab-2M24-mSA, оцененный с помощью визуализации в реальном времени IncuCyte (вверху), а также репрезентативные изображения pHrodo-положительных клеток через 3 часа

фагоцитоза (поглощенные частицы флуоресцируют ярко-красным в фагосомах) по сравнению с контролем без частиц (внизу). Слитый белок Fab 2M24-mSA индуцировал связывание и фагоцитоз частиц клетками НЕК 293, экспрессирующими дектин-1.

[041] На **Фиг. 22А-22D** показаны комплексы биспецифической молекулы, содержащие Fab 2M24-mSA и целевые биотинилированные антитела. Показан анализ Fab 2M24-mSA в комплексе с биотинилированным антителом к hCD20 (**Фиг. 22А**), биотинилированным антителом к hCD19 (**Фиг. 22В**), биотинилированным антителом к hCD70 (**Фиг. 22С**) или биотинилированным антителом к амилоиду β 1-42 (**Фиг. 22D**) методом ВЭЖХ. Каждая панель содержит наложение кривых при А280, включая только Fab 2M24-mSA, отдельно целевое биотинилированное антитело и Fab 2M24-mSA в комплексе с биотинилированным целевым антителом.

[042] На **Фиг. 23** показано связывание клеток НЕК293, экспрессирующих дектин-1, и клеток Raji, экспрессирующих CD20, индуцированное биспецифическими антителами Fab 2M24-mSA/биотинилированное анти-hCD20. Показан анализ совместных культур НЕК293 (помеченных кальцеином зеленым) и Raji (помеченных кальцеином красным) в присутствии биспецифической молекулы Fab 2M24-mSA/биотинилированное анти-hCD20 или изотипического биспецифического контроля (слева) методом проточной цитометрии. Совместные культуры инкубировали при 4°C или 37°C. На связывание клеток НЕК293 и Raji указывает двойной положительный сигнал (зеленый+ красный+; квадрат в пунктирной рамке). Также показана эффективность связывания, которая количественно определяется как процент от общего числа клеток-мишеней (Raji), которые образуют дублеты (справа). Столбцы представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение; n=4 повторности. Биспецифическая молекула Fab 2M24-mSA/биотинилированное анти-hCD20 индуцировала связывание экспрессирующих дектин-1 клеток НЕК293 и клеток Raji.

[043] На **Фиг. 24** представлена схема направленного фагоцитоза амилоидных отложений при амилоидозе с использованием агонистических биспецифических антител к дектину-1.

[044] На **Фиг. 25А-25В** показаны стратегии направленного истощения тучных клеток с использованием агонистических биспецифических антител против дектина-1. На **Фиг. 25А** представлена схема истощения тучных клеток агонистическими биспецифическими антителами к дектину-1. На **Фиг. 25В** показан перечень потенциальных мишеней для истощения тучных клеток.

[045] На **Фиг. 26** показан фагоцитоз больших (~ 16,2 мкм) меченных rhodo частиц дендритными клетками человека. На **Фиг. 26** показана количественная оценка фагоцитоза частиц в течение 12 часов (слева) и репрезентативные изображения rhodo-положительных клеток через 3 часа фагоцитоза (поглощенные частицы флуоресцируют ярко-красным цветом в фагосомах; справа). Антитело к дектину-1 способствовало

направленному фагоцитозу частиц культивируемыми дендритными клетками, происходящими из моноцитов.

[046] **На Фиг. 27** представлена схема направленного истощения микробов агонистическими биспецифическими антителами к дектину-1. Биспецифические антитела с плечом, связывающим дектин-1, и плечом, связывающим микробный агент, получают для нацеливания на бактерии, вирусы или грибки (вверху). Биспецифические антитела к Дектину-1 направляют фагоциты, экспрессирующие дектин-1, на уничтожение бактериальных, вирусных или грибковых патогенов (внизу).

[047] **На Фиг. 28А-28В** показано связывание биспецифических антител, состоящих из антитела к дектину-1 (клон 15Е2), конъюгированного с антителом к гемагглютининому Н3Н2 (клон 12СА5), с вирусом гриппа Н3Н2 и клетками, экспрессирующими дектин-1. **На Фиг. 28А** показан анализ связывания биспецифического антитела к дектину-1/гемагглютининому с вирусом гриппа Н3Н2 по оценке с помощью ИФА. 96-луночные планшеты для микротитрования покрывали частицами вируса гриппа Н3Н2 с последующей инкубацией одиночных антител, биспецифических антител и изотипических контролей. После тщательной промывки первичные антитела детектировали с помощью конъюгированного с НRP вторичного антитела к FcgR мыши. **На Фиг. 28В** показан анализ связывания биспецифического антитела к дектину-1/гемагглютининому с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1, с помощью проточной цитометрии. Клетки НЕК инкубировали с первичными антителами с последующим обнаружением с помощью вторичного флуоресцентного антитела против антитела к дектину-1 (анти-mIgG2a APC) или антитела к гемагглютининому (анти-mIgG2b PB). Биспецифическое антитело к дектину-1/гемагглютининому эффективно связывалось как с вирусом гриппа Н3Н2, так и с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1.

[048] **На Фиг. 29А-29В** показаны схематические диаграммы с использованием антител к дектину-1 для доставки антигенов для разработки вакцины, с использованием антител к дектину-1, слитых с антигенами-мишенями для доставки к APC (**Фиг. 29А**), или биспецифических антител к дектину-1 для направленной доставки патогенных агентов (например, клеток, микробов, белков и т. д.) к APC (**фиг. 29В**).

[049] **На Фиг. 30** показан фагоцитоз полистироловых частиц, меченных pHrodo, с антителом к Fc IgG мыши (~ 3,4 мкм), конъюгированных с антителом к дектину-1 (15Е2) или изотипическим контрольным антителом, дендритными клетками человека. Полистироловые частицы с антителом к Fc IgG мыши метили pH-чувствительным флуоресцентным красителем (pHrodo Red) и конъюгировали с антителом к дектину-1 или изотипическим контролем. Затем частицы инкубировали с культивируемыми дендритными клетками, происходящими из моноцитов, в соотношении 1:3 (клетки: частицы). Фагоцитоз частиц контролировали с помощью визуализации живых клеток IncuCyte. Фагоцитоз количественно определяли с использованием программного обеспечения для анализа IncuCyte и выражали как общую интегрированную интенсивность (общую суммарную интенсивность флуоресценции) красных объектов

(pHrodo) на изображении. На **Фиг. 30** показана количественная оценка фагоцитоза шариков в течение 9 часов (вверху) и репрезентативные изображения pHrodo-положительных клеток через 3 часа фагоцитоза (поглощенные частицы флуоресцируют ярко-красным цветом в фагосомах; внизу).

[050] На **Фиг. 31А-31С** показан фагоцитоз частиц, покрытых шиповидным белком SARS-CoV-2, клетками НЕК 293, экспрессирующими дектин-1. На **Фиг. 31А** представлена схематическая иллюстрация эксперимента. Частицы, покрытые шиповидным белком из SARS-CoV-2, связывают с клетками НЕК 293, экспрессирующими дектин-1, с помощью биспецифического антитела к дектину-1, содержащего плечо, связывающее белок дектин-1, и плечо, связывающее шиповидный белок. На **Фиг. 31В** показана проточная цитометрия, характеризующая взаимодействие эффектора (клетки НЕК 293) и мишени (частицы, покрытые шиповидными белками), биспецифического и изотипического контроля (панель А), а также количественная оценка эффективности связывания на основе популяции дублетов (панель В). На **Фиг. 31С** показан фагоцитоз частиц, покрытых шиповидным белком SARS-CoV-2, клетками НЕК 293 в эксперименте по совместному культивированию. Фагоцитоз частиц, меченных pHrodo, контролировали по изменению флуоресценции pHrodo в следствие кислого pH в фагосомах. На **Фиг. 31С** показана количественная оценка фагоцитоза (слева), которая была определена с помощью программного обеспечения для анализа Incucyte и выражена как перекрытие количества красных объектов (pHrodo) с кальцеин-положительными клетками, а также репрезентативные изображения pHrodo-положительных клеток через 2 часа фагоцитоза (поглощенные частицы флуоресцируют ярко-красным цветом в фагосомах; справа).

[051] На **Фиг. 32А и 32В** показан дизайн биспецифического антитела для биспецифических антител человека (например, биспецифических антител IgG1 человека), нацеленных на дектин-1 и связанную с заболеванием мишень или антиген. На **Фиг. 32А** представлена схема конструкции. Одно плечо (2M24A.X) с доменом VH A и доменом VL B нацелено на дектин-1 человека, тогда как другое плечо (2M24B.X) с доменом VH C и доменом VL D нацелено на связанную с заболеванием мишень или антиген. На **Фиг. 32В** представлена схема иллюстративного механизма действия биспецифического антитела к дектина-1 с активным доменом Fc, которое нацелено на дектин-1 человека (через первое плечо) на миелоидных клетках, антиген на клетке-мишени/патогенный агент (через второе плечо) и рецепторы Fc на миелоидных и NK-клетках, вызывая сильную иммунную стимуляцию и фагоцитоз.

[052] На **Фиг. 33А и 33В** показано, что биспецифическое антитело, одно плечо которого нацелено на дектин-1 человека, а другое плечо нацелено на hCD20 (с использованием переменных доменов ритуксимаба), связывается с клетками, экспрессирующими дектин-1 человека или человеческий CD20. На **Фиг. 33А** (верхняя панель) показано связывание биспецифического антитела, нацеленного на дектин-1 человека и hCD20 (2M24/CD20), или биспецифического антитела, нацеленного на дектин-

1 человека и RSV (2M24/RSV), с клетками HEK293, стабильно экспрессирующими дектин-1 человека, по оценке с помощью проточной цитометрии. На **Фиг. 33А** (нижняя панель) показано связывание конъюгированного с FITC биспецифического антитела 2M24/RSV hIgG1, и конъюгированного с FITC бивалентного антитела 2M24 hIgG1 с РВМС, по оценке с помощью проточной цитометрии. На **Фиг. 33В** показано связывание ритуксимаба (IgG1 человека), 2M24/CD20 с активным Fc IgG1 человека, 2M24/CD20 с инертным Fc IgG1 человека, 2M24/RSV с активным Fc IgG1 человека или 2M24/RSV с инертным Fc IgG1 человека с экспрессирующей CD20 линией клеток В-клеточной лимфомы Raji.

[053] На **Фиг. 34А и 34В** показано, что биспецифическое антитело, нацеленное на дектин-1 человека и hCD20 (2M24/CD20), индуцирует связывание клеток, экспрессирующих дектин-1 и CD20. **Фиг. 34А**: для оценки связывания клеток HEK293, экспрессирующих дектин-1 (эффектор), и клеток Raji, экспрессирующих CD20 (мишень), клетки дифференциально метили красителями кальцеином зеленым (эффектор) или кальцеином красным (мишень). Меченые клетки совместно культивировали и обрабатывали биспецифическим антителом 2M24/CD20 или 2M24/RSV (контроль) с инертным hIgG1 для индукции связывания эффектор:мишень. Успешное связывание эффекторных клеток-мишеней подтверждается двойным положительным окрашиванием (кальцеин зеленый⁺, кальцеин красный⁺, квадратная рамка). **Фиг. 34В**: титрование дозы биспецифических клеток в совместных культурах эффектор:клетки-мишени. Эффективность связывания количественно определяют как процент от общего числа клеток-мишеней, которые связываются или соединяются с эффекторными клетками.

[054] На **Фиг. 35А и 35В** показано, что биспецифическое антитело, нацеленное на дектин-1 человека и hCD20, (2M24/CD20) с активным Fc hIgG1, не вызывает истощения моноцитов за счет антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ). РВМС от двух здоровых доноров - донора 76 (**Фиг. 35А**) и донора 77 (**Фиг. 35В**) обрабатывали возрастающими концентрациями биспецифического антитела 2M24/CD20 (активные или инертные изоформы hIgG1) и ритуксимабом в течение 24 ч, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии для количественного определения уровней оставшихся живых CD14⁺ моноцитов (в % от изотипических контролей).

[055] На **Фиг. 36А и 36В** показано, что биспецифическое антитело, нацеленное на дектин-1 человека и hCD20 (2M24/CD20) с активным Fc hIgG1, вызывает более сильное истощение В-клеток по сравнению с ритуксимабом. РВМС от двух здоровых доноров - доноров 83 (**Фиг. 36А**) и 84 (**Фиг. 36В**) - обрабатывали возрастающими концентрациями указанных антител в течение 24 ч, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии для количественного определения уровней оставшихся живых CD19⁺ В-клеток (указаны как % В-клеток от РВМС, обработанных изотипическим контролем).

[056] На **Фиг. 37А и 37В** показано, что ритуксимаб индуцирует более сильное «подстригание» молекул с В-клеток (снижение уровня CD19) по сравнению с

биспецифическим антителом 2M24/CD20 с активным IgG1. Экспрессию CD19+ на В-клетках двух здоровых доноров - донора 83 (**Фиг. 37А**) и донора 84 (**Фиг. 37В**) - количественно определяли с помощью проточной цитометрии после 24-часовой инкубации с возрастающей концентрацией биспецифического антитела 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип), ритуксимаба или изотипических контролей. Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) для окрашивания CD19 с использованием антитела к CD19 (конъюгированного с BV605) использовали для оценки влияния биспецифической молекулы 2M24/CD20 и ритуксимаба на экспрессию CD19 на В-клетках. Значения EC50 рассчитывали на основе нелинейного регрессионного анализа.

[057] На **Фиг. 38** показано дифференциальное высвобождение цитокинов, индуцированное биспецифическим антителом 2M24/CD20 с активным IgG1, по сравнению с ритуксимабом. Количественное определение цитокинов на основе ИФА (Mesoscale Discovery) проводили в супернатантах, выделенных из PBMC здоровых доноров, обработанных биспецифическим антителом 2M24/CD20 с активным hIgG1, ритуксимабом или изотипическими контролями. PBMC стимулировали антителами в течение ночи, а затем супернатанты анализировали с помощью MSD. Протестированные цитокины представляли собой IFN γ , IL-12p70, IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-13, IL-10 и IL-8. На каждом графике показана секреция цитокинов (в пг/мл) в зависимости от антитела, используемого для лечения (слева направо: биспецифическая молекула 2M24/CD20 hIgG1, биспецифическая молекула 2M24/RSV hIgG1, ритуксимаб hIgG1 и изотипический контроль hIgG1).

[058] На **Фиг. 39А и 39В** показано, что биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) индуцирует превосходное истощение В-клеток и более слабое «подстригание» CD19 по сравнению с ритуксимабом в совместных культурах макрофагов человека и GFP-экспрессирующих В-клеток Raji. **FIG. 39А**: анализ совместных культур макрофагов человека и клеток Raji-GFP (соотношение 3:1) в присутствии биспецифической молекулы 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип), контроля 2M24/RSV, фукозилированного ритуксимаба или контроля изотипа hIgG1 с помощью проточной цитометрии. Совместные культуры инкубировали при 37°C в течение 24 часов, а затем окрашивали конъюгированным с PE Ат к CD206 для мечения макрофагов и антителом к CD19 BV-605 для мечения клеток Raji. Количество оставшихся живых/Raji-GFP+ клеток оценивали в конце эксперимента. Первичные антитела использовали при серийном титровании дозы. **Фиг. 39В**: оценка CD19 на клетках Raji-GFP через 24 часа. «Подстригание» В-клеточного рецептора показан как снижение СИФ CD19 в присутствии биспецифической молекулы к дектину-1/hCD20 или ритуксимаба.

[059] На **Фиг. 40А-40С** показано, что биспецифическое антитело 2M24/CD20 с активным IgG1 индуцирует более выраженное истощение тканевых В-клеток по сравнению с ритуксимабом в суспензии отдельных клеток биоптатов рака почки. Суспензии отдельных клеток из двух биоптатов ткани рака почки анализировали с помощью проточной цитометрии в присутствии биспецифического антитела 2M24/CD20

hIgG1 (активного или инертного), контролей 2M24/RSV hIgG1, фукозилированного ритуксимаба и соответствующих изотипических контролей. Биоптаты ткани рака почки диссоциировали на суспензии отдельных клеток и обрабатывали первичными антителами (2 мкг/мл) в течение 24 часов при 37°C. Популяции иммунных клеток анализировали с помощью проточной цитометрии. Первоначально клетки были отобраны для живых клеток, затем были разделены на CD45+ клетки (иммунные клетки) и CD45- клетки (неиммунные клетки), а затем в CD45+ популяции были идентифицированы CD19+ клеток (В-клетки) и CD3+ клеток (Т-клетки) (**Фиг. 40А и 40В**). Количество оставшихся В-клеток оценивали с помощью антитела к CD19 и выражали в процентах от популяции CD45+ иммунных клеток (**Фиг. 40С**).

[060] На **Фиг. 41А-41С** показано, что антитело к дектину 1 (клон 2M24) индуцирует кластеризацию дектина 1 и секрецию TNF α макрофагами человека. Была проанализирована секреция цитокинов культивируемыми макрофагами и суспензией одиночных клеток из биоптатов рака почки, стимулированных иммобилизованным антителом к дектину-1 (клон 2M24) или биспецифическим антителом 2M24/CD20. Антитело к дектину-1 (клон 2M24), изотипический контроль или биспецифическое антитело 2M24/CD20 иммобилизовали в течение ночи в полипропиленовых титрационных микропланшетах с U-образным дном в количестве 10 мкг на лунку с последующим культивированием макрофагов, происходящих из моноцитов человека, (**Фиг. 41А и 41В**) или суспензии одиночных клеток из биоптатов рака почки (**Фиг. 41С**). Клетки культивировали в течение 24 часов и оценивали секрецию TNF α в супернатанте с помощью ИФА. В качестве положительного контроля клетки стимулировали зимозаном.

[061] На **Фиг. 42** показано, что иммобилизованное антитело к дектину 1 (клон 2M24) способствует иммунной стимуляции в суспензии одиночных клеток из биоптатов рака почки. Суспензии одиночных клеток из биоптатов рака почки обрабатывали иммобилизованным антителом к дектину-1 (клон 2M24) или антителом изотипического контроля hIgG4 в течение 24 часов. Супернатанты анализировали с помощью ИФА на высвобождение различных цитокинов, включая IFN γ , IL-6, TNF α , IL-23, IL-12p70, IL-10 и IL-13. На каждом графике показано количество цитокина (пг/мл) в зависимости от обработки антителами. Показаны результаты лечения антителом к дектину-1 (клон 2M24) или антителом изотипического контроля hIgG4 с использованием донора 3 (слева) или донора 4 (справа) рака почки.

[062] На **Фиг. 43** показано влияние биспецифического антитела 2M24/CD20 на экспрессию CD16 в человеческих NK-клетках по сравнению с ритуксимабом или изотипическим контролем (RSV). Результаты демонстрируют, что уровни антигена CD16 на NK-клетках лучше поддерживаются в PBMC, обработанных биспецифической молекулой 2M24/CD20, по сравнению с ритуксимабом.

[063] На **Фиг. 44** показано влияние биспецифического антитела 2M24/CD20 на экспрессию CD19 в В-клетках человека по сравнению с ритуксимабом или изотипическим контролем (биспецифическая молекула 2M24/RSV). Результаты демонстрируют, что

уровни антигена CD19 лучше поддерживаются на В-клетках, обработанных биспецифической молекулой 2M24/CD20, по сравнению с ритуксимабом.

[064] **На Фиг. 45** показано истощение В-клеток человека биспецифическим антителом 2M24/CD20, полученным из ритуксимаба, или биспецифическим антителом 2M24/CD20, полученным из обинутузумаба. Результаты демонстрируют, что биспецифическая молекула 2M24/CD20, полученная из группы ритуксимаба, лучше истощает В-клетки по сравнению с биспецифической молекулой, полученной из обинутузумаба.

[065] **На Фиг. 46** показан дизайн поискового исследования безопасности и эффективности биспецифического антитела 2M24/CD20 у отличных от человека приматов.

[066] **На Фиг. 47 и 48** показано истощение циркулирующих В-клеток у яванских макаков под действием биспецифического антитела 2M24/CD20 hIgG1, получаемого в клетках, обработанных кифунензином (KIF). **Фиг. 47:** Истощение В-клеток у обезьян, получавших 5 мг/кг 2M24/CD20 hIgG1 KIF (верхний) или 2M24/CD20 с инертным hIgG1 (нижний). **Фиг. 48:** Истощение В-клеток у обезьян, получавших 5 мг/кг ритуксимаба hIgG1 KIF.

[067] **На Фиг. 49А и 49В** показано истощение присущих ткани В-клеток у яванских макаков с помощью биспецифического антитела 2M24/CD20 hIgG1, получаемого в клетках, обработанных кифунензином (KIF). **Фиг. 49А:** Истощение В-клеток в костном мозге обезьян, получавших 5 мг/кг 2M24/CD20 hIgG1 KIF или ритуксимаба hIgG1 KIF. **На Фиг. 49В:** Истощение В-клеток в лимфатических узлах обезьян, получавших 5 мг/кг 2M24/CD20 hIgG1 KIF или ритуксимаба hIgG1 KIF.

[068] **На Фиг. 50** показано истощение В-клеток из РВМС яванского макака *ex vivo*.

[069] **На Фиг. 51** показан формат биспецифической молекулы, в которой используется технология «выступы-во-впадины» для связывания обычного полуантитела к CD20 с плечом из слитых Fc и одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) к дектину-1 (scFv 2M24/CD20). Н: домен VH 2M24; L: домен VL 2M24.

[070] **На Фиг. 52А-52С** показана очистка и функциональная характеристика биспецифического антитела 2M24/CD20. **На Фиг. 52А** показана очистка молекулы с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ). **На Фиг. 52В** показано, что очищенное биспецифическое антитело способствовало направленной иммунной стимуляции, оцененной в репортерном анализе NFκB. **На Фиг. 52С** показано истощение В-клеток человека биспецифическим антителом scFv 2M24/CD20.

[071] **На Фиг. 53А-53С** показаны разработка и характеристика биспецифического антитела к дектину-1 (2M24)/Тгор-2. **На Фиг. 53А** показана очистка биспецифического антитела 2M24/Тгор-2 с помощью ЭХ (слева). Очищенное антитело анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невозстанавливающих (NR) или восстанавливающих (R) условиях (справа). **На Фиг. 53В и 53С** показана высокая аффинность связывания молекулы с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1 (**Фиг.**

53B), и умеренную аффинность связывания с экспрессирующей Trop-2 линией раковых клеток A431 (**Фиг. 53C**).

[072] **На Фиг. 54** показаны уровни экспрессии Trop-2 на раковых клетках.

[073] **На Фиг. 55A-55D** показано связывание биспецифического антитела 2M24/Trop-2 с экспрессирующими Trop-2 линиями клеток HeLa (**Фиг. 55A**), VxPC-3 (**Фиг. 55B**), SiHa (**Фиг. 55C**) и Саран-2 (**Фиг. 55D**). EC50 для связывания, определенная с использованием четырехпараметрической логистической (4PL) нелинейной регрессии, показано для каждой линии клеток.

[074] **На Фиг. 56A и 56B** показано истощение экспрессирующих Trop-2 линий клеток (клетки SKBR3 на **Фиг. 56A**; клетки A431 на **Фиг. 56B**) с использованием биспецифического антитела 2M24/Trop-2.

[075] **На Фиг. 57A и 57B** показана экспрессия Trop-2 и дектина-1 в биоптате рака легкого.

[076] **На Фиг. 58** показано истощение Trop-2-положительных раковых клеток в биоптате рака легкого.

[077] **На Фиг. 59A** показана активность биспецифического антитела 2M24/Trop-2 в репортерном анализе NFκB.

[078] **На Фиг. 59B-59E** показано, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 способствует презентации антигена и активации Т-клеток. **На Фиг. 59B** представлена схема анализа. **На Фиг. 59C**, макрофаги и клетки рака молочной железы SKBR3 совместно инкубировали в присутствии биспецифического антитела 2M24/Trop-2 hIgG1 или контрольного биспецифического антитела 2M24/RSV hIgG1. Фагоцитоз или истощение клеток SKBR3 оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания экспрессии EPCAM на клетках SKBR3. Данные представлены относительно контрольной биспецифической молекулы 2M24/RSV. **На Фиг. 59D**, уровни IFN-гамма в супернатантах количественно определяли с использованием набора BD OptiEIA. **На Фиг. 59E**, экспрессию CD69, маркера ранней активации, на Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены относительно общего числа CD3+ Т-клеток.

[079] **На Фиг. 60A и 60B** показаны дизайн и получение биспецифического антитела 2M24/нектин-4. **На Фиг. 60A** показана схема биспецифической молекулы. **На Фиг. 60B** показана очистка биспецифического антитела с использованием хроматографии с белком А.

[080] **На Фиг. 61A и 61B** показана экспрессия нектина-4 на линиях раковых клеток (**Фиг. 61A**) и раковых клетках из биоптатов первичной опухоли (**Фиг. 61B**).

[081] **На Фиг. 62** показано связывание биспецифического антитела 2M24/нектин-4 с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1, (вверху) или клетками A431, экспрессирующими нектин-4, (внизу).

[082] **На Фиг. 63** показана стимуляция дектина-1 в репортерном анализе NFκB биспецифическим антителом 2M24/нектин-4. На верхней панели показана схема анализа.

На нижней панели показаны результаты количественной оценки уровня SEAP в среде.

[083] На **Фиг. 64А и 64В** показано истощение раковых клеток, экспрессирующих нектин-4, с помощью биспецифического антитела 2М24/нектин-4. На **Фиг. 64А** показано обнаружение фагоцитоза/истощения с помощью проточной цитометрии. На **Фиг. 64В** показано истощение по сравнению с контролем RSV.

[084] На **Фиг. 65А-65С** показано, что биспецифическое антитело 2М24/11-1F4 связывается с амилоидами легкой цепи. На **Фиг. 65А** показана очистка исходного антитела к амилоиду 11-1F4 (верхнее) и биспецифического антитела 2М24/11-1F4 (нижнее) с помощью ЭХ. На **Фиг. 65В и 65С** показано связывание исходного антитела 11-1F4 (**Фиг. 65В**) или биспецифического антитела 2М24/11-1F4 (**Фиг. 65С**) с рекомбинантными амилоидами легкой цепи от разных пациентов (AL30, AL47, AL48 и AL55) с помощью Octet.

[085] На **Фиг. 66** показан фагоцитоз амилоидных фибрилл легкой цепи моноцитами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[086] Некоторые аспекты описаны ниже со ссылкой на примеры применений для иллюстрации. Следует понимать, что в этом описании изложены многочисленные конкретные детали, взаимосвязи и способы, чтобы обеспечить полное понимание функций, описанных в данном документе. Тем не менее, специалисту в соответствующей области техники будет понятно, что описанные в данном документе признаки могут быть реализованы на практике без одной или большего количества конкретных деталей или с помощью других способов. Описанные в данном документе признаки не ограничиваются проиллюстрированным порядком действий или явлений, поскольку некоторые действия могут происходить в разном порядке и/или одновременно с другими действиями или явлениями. Кроме того, не все проиллюстрированные действия или явления требуются для реализации методологии в соответствии с описанными в данном документе признаками.

[087] Применяемые в данном документе формы единственного числа предназначены для включения также форм множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включая», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты применяются в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины предназначены для включения, аналогично термину «содержащий». В контексте данного документа термин «содержащий» является синонимом слов «включающий» или «содержащий» и является включающим или неограничивающим.

[088] Любая ссылка на «или» в данном документе подразумевает охват «и/или», если не указано иное. В контексте данного документа термин «около» в отношении числа относится к этому числу плюс или минус 10% от указанного числа. Термин «около» в отношении диапазона означает указанный диапазон минус 10% от его наименьшего значения и плюс 10% от его наибольшего значения.

I. Антитела и полиспецифические связывающие белки

[089] В определенных аспектах в данном изобретении предложены антигенсвязывающие домены, антитела и фрагменты антител, которые связываются с человеческим дектином-1, а также полиспецифические (например, биспецифические) связывающие молекулы, содержащие их.

[090] В некоторых вариантах осуществления антитело и иммуноглобулин используются взаимозаменяемо, и в данном документе они используются в самом широком смысле и охватывают различные структуры антител, включая, помимо прочего, моноклональные антитела (например, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты антител и однодоменные антитела (как описано в данном документе более подробно), при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность.

[091] В некоторых вариантах осуществления антитела (иммуноглобулины) относятся к белку, имеющему структуру, по существу сходную со структурой нативного антитела, или к белку, имеющему переменные области тяжелой и легкой цепи, имеющие структуры, по существу сходные со структурами нативной переменной области тяжелой и легкой цепи. Нативные антитела относятся к природным молекулам иммуноглобулинов с различными структурами. Например, нативные иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины массой около 150000 дальтон, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидной связью. В направлении от N- к C-концу каждая тяжелая цепь имеет переменную область (VH), также называемую переменной тяжелой доменом или переменной доменом тяжелой цепи, за которой следуют три константных домена (CH1, CH2 и CH3), также называемых константной областью тяжелой цепи. Аналогичным образом в направлении от N- к C-концу каждая легкая цепь имеет переменную область (VL), которая также называется переменной легкой доменом или переменной доменом легкой цепи, за которой следует константный домен легкой цепи (CL), также называемый константной областью легкой цепи. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и в целом описаны, например, в Abbas et al., 2000, Cellular and Mol, и Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Антитела (иммуноглобулины) относят к разным классам в зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых можно разделить на подтипы, например, $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), $\alpha 1$ (IgA1) и $\alpha 2$ (IgA2). Легкая цепь иммуноглобулина может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин по существу состоит из двух молекул Fab и домена Fc, связанных через шарнирную область иммуноглобулина.

[092] В некоторых вариантах осуществления термин Fc, область Fc или домен Fc

относится к С-концевой области тяжелой цепи антитела, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Данный термин включает нативные последовательности областей Fc и варианты областей Fc. Fc может относиться к двум последним доменам иммуноглобулина константной области (например, CH2 и CH3) IgA, IgD и IgG, трем последним доменам иммуноглобулина константной области IgE и IgM и, необязательно, всему или части гибкого шарнира, который расположен на N-конце по отношению к этим доменам. В случае IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. Область Fc IgG содержит домен IgG CH2 и домен IgG CH3, а в некоторых случаях включает шарнир. Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков области Fc или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. Домены Fc IgG человека имеют особое применение в настоящем изобретении и могут представлять собой домен Fc из IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

[093] В данной области техники известны многочисленные определения последовательностей CDR переменных доменов антител; см., например, Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3) and Chothia. Если не указано иное, последовательности CDR описаны в данном документе в соответствии с определением IMGT. См., например, www.imgt.org/IMGTScientificChart/Nomenclature/IMGT-FRCDRdefinition.html.

[094] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с человеческим дектином-1, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с человеческим дектином-1, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTGLVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTVSSLPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

[095] Как отмечалось выше, также можно использовать определение Kabat для

последовательностей CDR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с человеческим дектином-1, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

[096] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с человеческим дектином-1, содержат домен VH, включающий последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL, включающий последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью

DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с человеческим дектином-1, содержат домен VH, включающий последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или домен VL, включающий последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела, которые связываются с человеческим дектином-1, содержат домен VH, включающий последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7); и домен VL, включающий последовательность DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

[097] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела являются гуманизированными.

[098] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим дектином-1, содержит тяжелую цепь, включающую последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGSYSFGYWGGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTGTKYTCNVDHKPSNTKVKDKRVEVKYGPCCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:11), и/или легкую цепь, включающую

последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIERTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12). В некоторых

вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим дектином-1, содержит

тяжелую

цепь,

включающую

последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGSYSFGYWGGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTGTKYTCNVDHKPSNTKVKDKRVEVKYGPCCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:11), и легкую цепь, включающую

последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIERTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12).

[099] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связываются с человеческим дектином-1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связываются с человеческим дектином-1, экспрессированным на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связывается с изоформой А человеческого дектина-1 и/или изоформой В человеческого дектина-1. В некоторых вариантах осуществления изоформа А человеческого дектина-1 содержит

аминокислотную последовательность
 MEYHPDLENLDEDGYTQLHFDSQSNTRIAVVSEKGSACAASPPWRLIAVILGILCLVILVIA
 VVLGTMAIWRNSNGSNTLENGYFLSRNKENHSQPTQSSLEDSVTPTKAVKTTGVLSSPC
 PPNWIIYEKSCYLFSMSLNSWDGSKRQCWQLGSNLLKIDSSNELGFIVKQVSSQPDNSFW
 IGLSRPQTEVPWLWEDGSTFSSNLFQIRTTATQENPSPNCVWIHVSVIYDQLCSVPSYSIC
 EKKFSM (SEQ ID NO:9). В некоторых вариантах осуществления изоформа В дектина-1
 человека содержит аминокислотную последовательность
 MEYHPDLENLDEDGYTQLHFDSQSNTRIAVVSEKGSACAASPPWRLIAVILGILCLVILVIA
 VVLGTMGVLSSPCPPNWIIYEKSCYLFSMSLNSWDGSKRQCWQLGSNLLKIDSSNELGFI
 VKQVSSQPDNSFWIGLSRPQTEVPWLWEDGSTFSSNLFQIRTTATQENPSPNCVWIHVS
 IYDQLCSVPSYSICEKKFSM (SEQ ID NO:10). В некоторых вариантах осуществления
 антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связываются с дектином-1
 человека, экспрессированным на поверхности клетки, с EC50 менее 5 нМ, менее 2 нМ,
 менее 1 нМ или менее 0,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления
 антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела способны связываться с
 дектином-1 человека и дектином-1 обезьяны, например, дектином-1 яванского макака.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен,
 антитело или фрагмент антитела конкурируют за связывание с дектином-1 человека с
 эталонным антителом, которое содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH),
 содержащий CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1),
 CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3,
 включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и вариабельный домен
 легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ
 ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3,
 включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах
 осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела
 конкурируют за связывание с дектином-1 человека с эталонным антителом, которое
 содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую
 последовательность DYYI (SEQ ID NO: 88), CDR-H2, включающую последовательность
 WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность
 NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий
 CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2,
 включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую
 последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления
 антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела конкурируют за связывание
 с дектином-1 человека с эталонным антителом, которое содержит вариабельный домен
 тяжелой цепи (VH), включающий последовательность
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTGLVTV
 SS (SEQ ID NO:7), и вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий

последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

[0101] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связывают тот же эпитоп дектина-1 человека, что и эталонное антитело, которое содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связывает тот же эпитоп дектина-1 человека, что и эталонное антитело, которое содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, антитело или фрагмент антитела связывают тот же эпитоп дектина-1 человека, что и эталонное антитело, которое содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO:7), и переменный домен легкой цепи (VL), включающий последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

[0102] Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и F_v, Fab'-SH, F(ab')₂, диатела, линейные антитела, одноцепочечные антитела, наноантитела, фрагменты scFv, VH и полиспецифические (например, биспецифические) антитела/фрагменты, образованные из фрагментов антител.

[0103] «Fab» (фрагмент связывания антигена) представляет собой часть антитела, которая связывается с антигенами и включает переменную область и CH1 тяжелой цепи, связанные с легкой цепью посредством межцепочечной дисульфидной связи.

[0104] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит область Fc. Антитело может относиться к любому классу или подклассу, включая IgG и его подклассы (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE, IgA и IgD.

Область Fc молекулы иммуноглобулина, которая вызывает направленный фагоцитоз, может играть важную роль в этом процессе, взаимодействуя с Fc-рецепторами и индуцируя дополнительный фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления молекула имеет модифицированную область Fc, которая имеет сниженную активность АЗКЦ по сравнению с человеческим IgG1 дикого типа (например, содержащую одну или более мутаций, снижающих эффекторную функцию, как описано в данном документе).

[0105] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению содержит область Fc, при этом углеводная структура, присоединенная к области Fc, имеет пониженное содержание фукозы или не содержит фукозу, например, по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела нефукозилированы. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена композиция, содержащая антитело по настоящему изобретению, содержащее область Fc, при этом углеводная структура, присоединенная к области Fc, имеет пониженное содержание фукозы или не содержит фукозу, например, по меньшей мере, одна или две тяжелые цепи антитела нефукозилированы. В некоторых вариантах осуществления менее 50% связанных с N-гликозидом углеводных цепей в композиции содержат остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления по существу ни одна из связанных с N-гликозидом углеводных цепей не содержит остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления антитело с пониженным содержанием фукозы или без фукозы обладает улучшенной функцией АЗКЦ.

[0106] В других вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению (например, антитело IgG1) или композиция, содержащая антитело по настоящему изобретению (например, антитело IgG1), имеет гликозилирование области Fc дикого типа. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены фукозилированные антитела по настоящему изобретению (например, антитело IgG1) или композиции, содержащие фукозилированное антитело по настоящему изобретению (например, антитело IgG1).

[0107] Фукозилирование или фукозилированные антитела могут относиться к присутствию остатков фукозы в составе олигосахаридов, присоединенных к пептидному остову антитела. В частности, фукозилированное антитело содержит α -(1,6)-связанную фукозу на самом внутреннем остатке N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в одном или обоих N-связанных олигосахаридах, присоединенных к области Fc антитела, например, в положении Asn 297 область Fc IgG1 человека (нумерация EU остатков области Fc). Asn297 также может быть расположен примерно на +3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в иммуноглобулинах. Нефукозилированные или дефицитные по фукозе антитела имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы на том же антителе, продуцируемом в линии клеток. Фукозилирование антитела можно измерить, например, в композиции антитела, обработанной N-гликозидазой F, которая оценивается с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-

активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI TOF MS).

[0108] В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более мутаций, которые уменьшают или устраняют фукозилирование, например, замену в положении Asn 297 области Fc IgG1 человека (нумерация EU для остатков области Fc). Необязательно область Fc дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен, которые дополнительно улучшают АЗКЦ, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (нумерация EU для остатков). Примеры публикаций, связанных с «дефукозилированными» или «дефицитными по фукозе» антителами, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004).

[0109] В некоторых вариантах осуществления афукозилированное или нефукозилированное антитело продуцируют в линии клеток с генетической модификацией, которая приводит к афукозилированному или нефукозилированному антителу. Примеры линий клеток, продуцирующих афукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилированию белков, (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); US Pat Appl No US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и линии клеток с нокаутом, например, гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, клетки с нокаутом CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)), клетки, сверхэкспрессирующие β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III) и μ -маннозидазу аппарата Гольджи II (ManII), и клетки с нокаутом по маннозилгликопротеин-2-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (MGAT1; см. Вугне, G. et al. (2018) *PLoS Biol.* 16:e2005817).

[0110] В некоторых вариантах осуществления афукозилированное или нефукозилированное антитело продуцируется в линии клеток, обработанной ингибитором гликопроцессирующего фермента(-ов), таким как кифунензин, который является ингибитором маннозидазы I (см., например, Elbein, A.D. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:15599-15605). Например, клетки можно центрифугировать и ресуспендировать в питательной среде, содержащей кифунензин (например, в концентрации 250 мкг/мл), затем культивировать и использовать для получения антител.

[0111] В определенных аспектах настоящее изобретение относится к полиспецифическим (например, биспецифическим) антителам и фрагментам антител, содержащим первый антигенсвязывающий домен, который связывается с первой представляющей интерес мишенью, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается со второй представляющей интерес мишенью. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифическим (например, биспецифическим) антителам и фрагментам антител, содержащим первый

антигенсвязывающий домен, который связывается с дектином-1 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющей интерес мишенью.

[0112] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические (например, биспецифические) антитела и фрагменты антител содержат первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий первый антигенсвязывающий домен, и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий второй антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент связаны со вторым антителом или фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным и биотином или их авидинсвязывающим производным.

[0113] В данной области техники известны примеры авидинов, стрептавидинов, нейтравидинов или их биотинсвязывающих производных. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин представляет собой мономерный стрептавидин (mSA). В данной области техники известны примеры биотинов или их авидинсвязывающих производных. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению являются биотинилированными. Наборы для биотинилирования представляющего интерес антитела известны в данной области техники и имеются в продаже. В некоторых вариантах осуществления mSA включает последовательность EFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEKGSGPATEQGQDTFTKVKPSAASGS (SEQ ID NO:14).

[0114] В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывает дектин-1 человека и связано с mSA через линкер, включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSYFGYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPKNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGGSGGGSEFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEWNNSTE

NCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEAGSGPATEQGGQDTFTKVKPSAASGS (SEQ ID NO:15). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, который связывает дектин-1 человека и связан с mSA через линкер, включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKSSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGSYSFGYWGQGTLLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVGGGSGGGSGGGSEFASAEA GITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRV EWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEAGSGPATEQGGQDTFTKVKPSA ASGS (SEQ ID NO:16) или QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKSSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGSYSFGYWGQGTLLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVGGGSGGGSGGGSEFASAEA GITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRV EWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEAGSGPATEQGGQDTFTKVKPSA ASGSAAAGASHHHHHH (SEQ ID NO:17).

[0115] В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго антигенсвязывающего домена, антитела или фрагмента являются гуманизированными.

[0116] В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго антигенсвязывающего домена, антитела или фрагмента содержат метку, например, для аффинной очистки. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой полигистидиновую метку.

[0117] В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, наноантитела или фрагменты scFv. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов дополнительно содержат домен Fc. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляет собой фрагмент Fab, а второе антитело или его фрагмент представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления первое и второе антитела или фрагменты представляют собой полноразмерные антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляет собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), а второе антитело или его фрагмент представляет собой биотинилированное полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело, связанное с мономерным стрептавидином (mSA), а второе антитело или его фрагмент представляют собой биотинилированное полноразмерное антитело.

[0118] В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным

или связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным через линкер. В данной области техники известны линкеры для создания слитых белков антител. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит, состоит или по существу состоит из остатков глицина и/или серина. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет 15-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:13). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит один или более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO:26). В некоторых вариантах осуществления линкер включает последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:27) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28). Дополнительные линкерные последовательности описаны в Chen, X. et al. (2013) Adv. Drug Deliv. Rev. 65:1357-1369. В некоторых вариантах осуществления (например, в scFv по настоящему изобретению) scFv содержит линкер одного типа между доменами VH и VL и линкер другого типа, соединяющий домен VL с остальной частью полуантитела, например, с областью Fc. Например, в некоторых вариантах осуществления линкер между доменами VH и VL содержит остатки глицина и/или серина, такие как GGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO:13), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:27), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28), или один или более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO:26); и/или линкер, соединяющий домен VL с областью Fc, содержит EPKRSDKTHTCPPC (SEQ ID NO:29) или SATHTCPPC (SEQ ID NO:30). В некоторых вариантах осуществления линкер между доменами VH и VL содержит остатки глицина и/или серина и имеет длину 15-20 аминокислот.

[0119] В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека (например, изоформ(-ы) А и/или В). В некоторых вариантах осуществления вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления вторая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека (например, изоформа(-ы) А и/или В). В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

[0120] В определенных аспектах настоящее изобретение относится к полиспецифическим (например, биспецифическим) антителам и фрагментам антител, содержащим по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который связывается с дектином-1 человека. Любой из антигенсвязывающих доменов, которые связываются с дектином-1 человека по настоящему изобретению, может найти применение в полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекуле, антителе или фрагменте антитела. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, антитело или фрагмент антитела дополнительно содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющей интерес мишенью, например, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень

представляет собой патогенный агент.

[0121] В некоторых вариантах осуществления полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, связанную с доменом VH. В некоторых вариантах осуществления плечо scFv связывается с дектином-1, а плечо обычного антитела с доменами VH и VL на отдельных полипептидах связывается с представляющей интерес мишенью, например, как описано в данном документе, такой как патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или при этом вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит первый линкер между доменами VH и VL (например, длиной 15-20 аминокислот) и второй линкер между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первый линкер содержит один или более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO:26), *например*, последовательность GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:27) или GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:28). В некоторых вариантах осуществления второй линкер включает последовательность EPKRSDKTHTCPPC (SEQ ID NO:29) или SATHTCPPC (SEQ ID NO:30). Дополнительные линкерные последовательности описаны в Chen, X. et al. (2013) Adv. Drug Deliv. Rev. 65:1357-1369. Неограничивающий пример этого формата показан на **Фиг. 51**.

[0122] В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат, частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой белковый агрегат или его мономер, например, бета-амилоид (например, при болезни Альцгеймера) или амилоид легкой цепи лямбда или каппа (например, при амилоидозе легкой цепи). В некоторых вариантах осуществления, например, для применения в онкологии, второй интересующей мишенью является CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR, например, экспрессированный на поверхности раковой клетки.

[0123] В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой CD20, например CD20 человека. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, включает последовательность CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSA (SEQ ID NO:24), и/или последовательность CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3 из последовательности домена VL QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, содержит домен VH, который включает последовательность QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSA (SEQ ID NO:24), и/или домен VL, который включает последовательность QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, содержит последовательности доменов VH и VL из ритуксимаба. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, содержит последовательности доменов VH и VL из обинитузумаба. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD20, содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:46, и/или домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:47.

[0124] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с представляющей интерес мишенью (например, патогенным агентом по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом

VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTGLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEEPKRSKDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31).

[0125] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с CD20 (например, CD20 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTGLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEEPKRSKDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:24, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:25. В некоторых вариантах осуществления

второе плечо антитела содержит второй полипептид, включающий последовательность
 QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD
 TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
 TTVTVAASSTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 VSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32), и третий
 полипептид, содержащий аминокислотную последовательность
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVVPRF
 SGGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTL
 KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33).

[0126] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с HER2 (например, HER2 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEEPKRSKDTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSL

SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH, включающий последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMNIDYINHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:34), и домен VL, включающий последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:35). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает HER2, содержит последовательности доменов VH и VL из трастузумаба.

[0127] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с Троп-2 (например, Троп-2 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYINHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGQGLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGTDFLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах реализации второе плечо антитела содержит домен VH, включающий последовательность QVQLQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTG
EPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:42), и домен VL, включающий последовательность

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSI AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQH YITPLTFGAGTKVEIK (SEQ ID NO:43). В
некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH,
включающий последовательность
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTKTGE
PTYAEFEKGRFAFSLETSASTAYLQINN LKKEDTATYFCGRGGYGSSYWFVDVWGAGT
TVTSS (SEQ ID NO:56), и домен VL, включающий последовательность
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSI AVAWYQQKPGQSPKVL IYSASYRYTGVP
DRFTGSGSGTDFTFITSRVQAEDLAVYYCQQH YITPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:57).
В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH,
включающий последовательность
QVQLQQSGPELVRPGTSVRISCKASGYTFTIYWLGWVKQRPGHGLEWIGNIFPGSAYIN
YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGSNSGYWGQGTTLTVSS
(SEQ ID NO:58), и домен VL, включающий последовательность
DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMTCKSSQSL LNSGNQQNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCQSDHIYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
NO:59). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен
VH, включающий последовательность
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWTGGSTDYN
SALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGDYDRYTMDYWGQGTTLTV
SS (SEQ ID NO:66), и домен VL, включающий последовательность
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLE
SGVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTYTFGQGTKLEIK (SEQ ID
NO:67). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который
связывает Троп-2, содержит последовательности доменов VH и VL из сацитузаба,
AR47A6.4.2, h7E6 или Pr1E11.

[0128] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с амилоидами легкой цепи (например, амилоидами легкой цепи человека, например, амилоидами легкой цепи каппа человека, амилоидами легкой цепи лямбда человека или амилоидами легкой цепи каппа и лямбда человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций,

образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGSYSFGYWGGTGLVTV
SSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
GPGTKVDIEEPKRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность

QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNY
KPNLMSRLSISKDISKSQVLFKLNLSLQTDATYYCVTLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID
NO:44), и домен VL, включающий последовательность

DVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCFQTTYPNTFGGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:45). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен

VH, включающий последовательность

EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNY
AIYYADSVKDRFTIFRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPYSDFSAYWGQGLTV
TVSA (SEQ ID NO:52), и домен VL, включающий последовательность

DVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:53). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен

VH, включающий последовательность

EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNY
AIYYADSVKDRFTIFRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPYSDFSAYWGQGLTV
TVSA (SEQ ID NO:54), и домен VL, включающий последовательность

DVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSLSLVHSTGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTYFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:55). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который

связывает амилоид легкой цепи, содержит последовательности доменов VH и VL из антител 11-1F4, 2A4 или 7D8.

[0129] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая

содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с бета-амилоидом (например, бета-амилоидом человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGGTLVTV
SSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGTK
KYYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVW
GKGTITVTVSS (SEQ ID NO:48), и домен VL, включающий последовательность
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:49). В

некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH,
включающий последовательность

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIY
YGDTVKGRFTISRDNKNSLFLQMSSLRAEDTAVYYCAREGGYYYGRSYYTMDYWGQ
GTTVTVSS (SEQ ID NO:50), и домен VL, включающий последовательность
DVVMTQSPLSLPVTTPGAPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGIYYCFQGSHPPTFGPGTKLEIK (SEQ ID
NO:51). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который
связывает бета-амилоид, содержит последовательности доменов VH и VL из адуканумаба

или леканемаба.

[0130] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с CD70 (например, CD70 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSYFGYWGGTLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела
 содержит домен VH, включающий последовательность
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKGLEWVSDINNEGGTT
 YYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAGYSNHNVPFDSWGQGT
 LVTVSS (SEQ ID NO:38), и домен VL, включающий последовательность
 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSDNFPTWYQQTPGQAPRLLIYNTNTRHSG
 VPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQLTVL (SEQ ID
 NO:39). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который
 связывает CD70, содержит последовательности доменов VH и VL из 4ID12.

[0131] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются

с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с нектином-4 (например, нектином-4 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGQGLTVTV
SSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLA
WYQ QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQA
YSFPPTFGPGTKVDIEEPKRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIY
YADSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVS
S (SEQ ID NO:40), и домен VL, включающий последовательность
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAANSFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41). В

некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH, включающий последовательность

QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLVGIWSSGGSTD
YNAAFISRLSISKDTSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCARELIHAMDNWGQGTSTVTVSS
(SEQ ID NO:60), и домен VL, включающий последовательность
DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGNPQLLVFAATNLADGVP
SRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGTYYCQHFHWGTPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:61). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает нектин-4, содержит последовательности доменов VH и VL из N41 или Ha22-2.

[0132] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая

содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с EGFR (например, EGFR человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность
QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLVGVIWSSGGNTD
YNTPFTRSLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTV
VSA (SEQ ID NO:62), и домен VL, включающий последовательность
DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS
GSGSGTDFTLTINSVESEDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:63). В

некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH, включающий последовательность

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTD
YNPSLKSRTVMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLVTV
VSS (SEQ ID NO:64), и домен VL, включающий последовательность
EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQYGSTPLTFGGGTKAEIK (SEQ ID NO:65). В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает EGFR, содержит последовательности доменов VH и VL из цетуксимаба или

нецитумумаба.

[0133] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с DLL3 (например, DLL3 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTG
EPTYADDFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARIGDSSPSDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:68), и домен VL, включающий последовательность
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQSVSNVWVYQQKPGQAPRLLIYYASNRYTGIP
ARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQDYTSPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:69). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH, включающий

последовательность
QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGTTNY
NPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGGTLVTVSS
(SEQ ID NO:70), и домен VL, включающий последовательность
EIVLTQSPGTLSLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIP

DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:71). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает DLL3, содержит последовательности доменов VH и VL из ровампитузумаба или DLL3-4.

[0134] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином (например, мезотелином человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGGTLVTV
SSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность
QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSSTPVT
VSS (SEQ ID NO:72), и домен VL, включающий последовательность
DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK (SEQ ID NO:73). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает мезотелин, содержит последовательности доменов VH и VL из аматуксимаба.

[0135] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая

содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, CD33 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGQGLTVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
 GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела
 содержит домен VH, включающий последовательность
 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIYPYNGGTD
 YNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDFAFYVCVNGNPWLAYWGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO:74), и домен VL, включающий последовательность
 DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYAASNQGS
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQTKEVPWSFGQGTVKVEVK (SEQ ID
 NO:75). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который
 связывает CD33, содержит последовательности доменов VH и VL из гемтузумаба.

[0136] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH,

при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с CCR8 (например, CCR8 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела
 содержит домен VH, включающий последовательность
 EVQLVESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFAFNTYALYWIRQAPGKGLEWVARIRSKSNNY
 ATYYADSVKDRFTISRDDSQSMMLYLQMNLLKTEDTAMYYCVRARFYYSYGYAMDY
 WGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:76), и домен VL, включающий последовательность
 DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLA
 SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
 NO:77). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который
 связывает CCR8, содержит последовательности доменов VH и VL из 10A11.

[0137] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с CTLA4 (например, CTLA4 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций,

образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGGTGLVTV
 SSSGGGGSSGGGGSSGGGGSSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
 GPGTKVDIEEPKRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTKAKKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела
 содержит домен VH, включающий последовательность
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNK
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGGTGLVTV
 SS (SEQ ID NO:78), и домен VL, включающий последовательность
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFTGQGTKVEIK (SEQ ID NO:79). В
 некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает
 CTLA4, содержит последовательности доменов VH и VL из ипилимумаба.

[0138] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с cMET (например, cMET человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную

последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTGLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
 GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSD
 TRFNPNFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGLV
 TVSS (SEQ ID NO:80), и домен VL, включающий последовательность
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAST
 RESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
 NO:81). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который
 связывает сMET, содержит последовательности доменов VH и VL из онартузамаба.

[0139] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с LIV-1 (например, LIV-1 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTGLVTV
 SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQ
 QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF

GPGTKVDIEEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела содержит домен VH, включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTIEDYYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENG DTEYAPTFQGRVTMTRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARHDAHNGTWFAFWGQGLTLVTVSS (SEQ ID NO:82), и домен VL, включающий последовательность DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIRNDGNTYLEWYQQRPGQSPRRLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:83). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает LIV-1, содержит последовательности доменов VH и VL из hLIV14.

[0140] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с ROR-1 (например, ROR-1 человека). В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLAWYQ QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF GPGTKVDIEEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYAFTAYNIHWVRQAPGQGLEWMGSFDPYDGGSSYNQKFKDRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARGWYDFDYWGHGTLVTVSS (SEQ ID NO:84), и домен VL, включающий последовательность DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRASKSISKYLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFCQQHDESPYTFGEGTKVEIK (SEQ ID NO:85). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает ROR-1, содержит последовательности доменов VH и VL из Ab1.

[0141] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена полиспецифическая (например, биспецифическая) связывающая молекула, которая содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL по настоящему изобретению, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH в сочетании с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL, и вторую область Fc, соединенную с доменом VH, при этом домены VH и VL второго плеча антитела образуют антигенсвязывающий домен, который связывается с сывороточным амилоидом (SAP), например, SAP человека. В некоторых вариантах осуществления первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер по настоящему изобретению между доменами VH и VL и второй линкер по настоящему изобретению между доменом VL и первой областью Fc. В некоторых вариантах осуществления первое плечо антитела содержит аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
GPGTKVDIEEPKRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления второе плечо антитела

содержит домен VH, включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQKFGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:86), и домен VL, включающий последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIHNNAKTLAEGVPS

RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHNYGAPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:87). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает SAP, содержит последовательности доменов VH и VL из дезамизумаба.

[0142] Полиспецифические антитела обладают специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами, обычно из разных антигенов. Полиспецифические или биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифические антитела F(ab')₂).

[0143] Для обеспечения целенаправленного удаления патогенного агента посредством фагоцитоза антигенсвязывающий домен по настоящему изобретению может быть выбран из IgG, интрател, пептидных тел, наноантител, однодоменных антител, SMTP и полиспецифических антител (например, биспецифических антител, диател, триател, тетрател, тандемного ди-scFv, тандемного три-scFv, ADAPTIR).

[0144] Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Одним из хорошо зарекомендовавших себя подходов к получению биспецифических антител является подход «выступы-во-впадины» или «выпуклость-в-полость». См. например, патент США № 5731168. Каждый из двух полипептидов иммуноглобулина (например, полипептидов тяжелой цепи) имеет поверхность взаимодействия; поверхность взаимодействия одного полипептида иммуноглобулина взаимодействует с соответствующей или родственной поверхностью взаимодействия другого полипептида иммуноглобулина, тем самым позволяя двум полипептидам иммуноглобулина ассоциироваться. В некоторых вариантах осуществления поверхности взаимодействия могут быть сконструированы таким образом, что «выступ» или «выпуклость», расположенные на поверхности взаимодействия одного полипептида иммуноглобулина, соответствуют родственным «впадине» или «полости», расположенным на поверхности взаимодействия другого полипептида иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления выступ может быть сконструирован путем замены небольшой боковой цепи аминокислоты на более крупную боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления впадина может быть сконструирована путем замены большой боковой цепи аминокислоты на меньшую боковую цепь. Выступы или впадины могут присутствовать в исходной поверхности взаимодействия или могут быть введены искусственно. Полинуклеотиды, кодирующие модифицированные полипептиды иммуноглобулина с одной или более соответствующими мутациями, образующими выступ или впадину, могут быть экспрессированы и очищены с использованием стандартных рекомбинантных методов и клеточных систем, известных в данной области техники. См., например, патенты США №№ 5731168; 5807706; 5821333; 7642228; 7695936; 8216805; 8679785; 8844834; публикации патента США № 2013/0089553; Spiess et al., Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013; и Ridgway and Carter (1996) Protein Eng. 9:617-621. Модифицированные полипептиды иммуноглобулина могут быть получены с использованием прокариотических клеток-хозяев, таких как E. coli, или эукариотических

клеток-хозяев, таких как клетки млекопитающих (например, клетки CHO) или дрожжевые клетки. Соответствующие полипептиды иммуноглобулина, имеющие выступы и впадины, могут быть экспрессированы в клетках-хозяевах в совместной культуре и очищены вместе в виде гетеромультимера, или они могут быть экспрессированы в отдельных культурах, очищены отдельно и собраны *in vitro*. Примеры родственных мутаций, образующих выступ и впадину, представлены ниже (нумерация согласно индексу EU). Используемая в данном документе нумерация EU известна в данной области техники; см., например, ресурсы IMGT на www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html и www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGKCnber.html. В контексте данного документа термин «плечо антитела» может относиться к спариванию между тяжелой цепью антитела и легкой цепью антитела, где переменные домены тяжелой и легкой цепей образуют антигенсвязывающий сайт, который связывает антиген-мишень.

| | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Область Fc 1 | Y407T | Y407A | F405A | T394S | T366S L368A Y407V | T394W Y407T | T394S Y407A | T366W T394S |
| Область Fc 2 | T366Y | T366W | T394W | F405W | T366W | T366Y F405A | T366W F405W | F405W Y407A |

[0145] Согласно другому подходу переменные домены антител с желаемой специфичностью связывания (сайты связывания антитело-антиген) сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулина.

[0146] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические (например, биспецифические) антитела дополнительно содержат одну или более мутаций только в одном из плеч антитела для улучшения спаривания тяжелой цепи/легкой цепи. Например, аминокислотные замены можно использовать для замены нативной дисульфидной связи на границе раздела CH1-CL одного плеча антитела сконструированной дисульфидной связью. См., например, Mazar, Y. et al. (2015) *MAbs* 7:377-389 и EP3452089A2. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое или биспецифическое антитело содержит две легкие цепи антитела и две тяжелые цепи антитела, при этом только одна из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотные замены F126C и C220V, и только соответствующая или родственная легкая цепь содержит аминокислотные замены S121C и C214V, согласно нумерации EU.

[0147] Полиспецифические (например, биспецифические) антитела также включают сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. В литературе также описаны способы получения биспецифических антител из фрагментов антител. Например, биспецифические антитела можно получить с использованием химического связывания. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, ковалентно связанное со вторым антителом IgG, содержащим второй антигенсвязывающий домен.

[0148] В некоторых вариантах осуществления полиспецифические (например,

биспецифические) антитела дополнительно содержат одну или более мутаций только в одном из плеч антитела для снижения аффинности связывания с белком А. См., например, Ollier, R. et al. (2019) MAbs 11:1464-1478 и AU2018204314. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое или биспецифическое антитело содержит две легкие цепи антитела и две тяжелые цепи антитела, при этом только одна из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотные замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU.

[0149] В некоторых вариантах осуществления моноспецифические или полиспецифические (например, биспецифические) антитела дополнительно содержат одну или более мутаций для снижения эффекторной функции, например, для снижения или устранения связывания области Fc с Fc-рецептором. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две области Fc антитела, при этом области Fc антитела содержат аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит две области Fc антитела, причем области Fc антитела содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU.

[0150] В некоторых вариантах осуществления моноспецифические или полиспецифические (например, биспецифические) антитела содержат две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH второй тяжелой цепи антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, и при этом тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU. В некоторых вариантах осуществления тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека.

[0151] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен полинуклеотид, кодирующий антитело или полиспецифическую связывающую молекулу в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен вектор (например, вектор экспрессии), содержащий полинуклеотид по любому из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена клетка-хозяин (например, выделенная клетка-хозяин или линия клеток), содержащая полинуклеотид или вектор в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или полиспецифическую связывающую молекулу в соответствии с любым из указанных выше вариантов

осуществления и фармацевтически приемлемый носитель. Любой из них может найти применение в описанных в данном документе способах получения и/или лечения.

[0152] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен способ получения антитела или полиспецифической связывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина в соответствии с любым из указанных выше вариантов осуществления в условиях, подходящих для продукции антитела или полиспецифической связывающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение антитела или полиспецифической связывающей молекулы. Антитела или полиспецифические связывающие молекулы могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методов, как описано в данном документе и/или как проиллюстрировано ниже.

[0153] Антитела и фрагменты антител могут быть получены с использованием рекомбинантных способов. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая антитело/фрагмент, может быть выделена и встроена в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования или экспрессии. ДНК, кодирующую антитело/фрагмент, можно легко выделить и секвенировать с использованием обычных процедур (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела/фрагмента). В данной области техники известно много векторов; компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, один или более из следующего: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. Пригодными клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в данном документе являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот. При использовании рекомбинантных методов антитело/фрагмент можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическое пространство или непосредственно секретировать в среду. Если антитело/фрагмент получают внутриклеточно, частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, удаляют, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Когда антитело/фрагмент секретировается в среду, супернатанты из таких систем экспрессии, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка.

[0154] В некоторых вариантах осуществления антитело или полиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению являются частью фармацевтической композиции, например, содержащей антитело и один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, могут быть приготовлены путем смешивания активных ингредиентов (таких как слитый белок), имеющих желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (*Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)*), в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители являются в

общем случае нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают, но не ограничиваются этим, буферные вещества, например, фосфат, цитрат и другие органические соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты; низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, например, поливинилпирролидон; аминокислоты; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, например, ЭДТА; сахара, например, сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; солеобразующие противоионы, например, натрия; металлсодержащие комплексы (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные сурфактанты, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0155] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к наборам или промышленным изделиям, содержащим любое из описанных в данном антител или полиспецифических связывающих молекул. В некоторых вариантах осуществления, промышленное изделие содержит контейнер и этикетку или листок-вкладыш в упаковке, нанесенный на или связанный с контейнером. В некоторых вариантах осуществления набор или промышленное изделие дополнительно содержит инструкции по применению антитела или полиспецифической связывающей молекулы в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе, например, для лечения заболевания или нарушения, такого как злокачественное новообразование.

[0156] Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения патологического состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для растворов для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере один активный агент в композиции представляет собой антитело или полиспецифическую связывающую молекулу, как описано в данном документе. На этикетке или на листке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения конкретного патологического состояния. Этикетка или листок-вкладыш в упаковку будут дополнительно содержать инструкции по введению антитела или композиции полиспецифической связывающей молекулы субъекту. Также рассматриваются промышленные изделия и наборы, включающие описанные в данном документе комбинированные препараты.

II. Способы получения и идентификации

[0157] В определенных аспектах в настоящем изобретении предложены способы получения или создания полиспецифических (например, биспецифических) антител и фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления способы включают получение первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывается с первой представляющей

интерес мишенью; обеспечение второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего второй антигенсвязывающий домен, который связывается со второй представляющей интерес мишенью; и приведение в контакт первого антитела или его фрагмента со вторым антителом или фрагментом в условиях, подходящих для связывания между первым антителом или его фрагментом и вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным и биотином или его авидинсвязывающим производным, в результате чего образуется полиспецифическая связывающая молекула. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным. Любой из антигенсвязывающих доменов, антител и фрагментов антител по настоящему изобретению (например, как описано выше в разделе I) может быть получен или создан с использованием способов создания или получения полиспецифических (например, биспецифических) антител и фрагментов антител, описанных в данном документе. Преимущественно, эта платформа обеспечивает модульный формат для создания множества полиспецифических (например, биспецифических) связывающих молекул, в которых отдельные антигенсвязывающие домены, антитела и/или фрагменты антител связаны друг с другом посредством высокоаффинного взаимодействия авидин: биотин.

[0158] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены способы идентификации полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекулы, которая связывает первую и вторую представляющие интерес мишени. В некоторых вариантах осуществления способы включают получение первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывается с первой представляющей интерес мишенью; обеспечение второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего второй антигенсвязывающий домен, который связывается со второй представляющей интерес мишенью; и приведение в контакт первого антитела или его фрагмента со вторым антителом или фрагментом в условиях, подходящих для связывания между первым антителом или его фрагментом и вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным и биотином или его авидинсвязывающим производным, в результате чего образуется полиспецифическая связывающая молекула, и измерение связывания между полиспецифической связывающей молекулой и по меньшей мере одной из первой и второй представляющих интерес мишеней. В некоторых вариантах осуществления первое антитело или его фрагмент связаны с авидином,

стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным. В некоторых вариантах осуществления второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотинсвязывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидинсвязывающим производным. Преимущественно эта платформа позволяет проводить скрининг множества антигенсвязывающих доменов на предмет связывания представляющей интерес мишени в полиспецифическом (например, биспецифическом) формате.

[0159] В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека (например, изоформ(-ы) А и/или В). В некоторых вариантах осуществления вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент. В некоторых вариантах осуществления вторая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека (например, изоформа(-ы) А и/или В). В некоторых вариантах осуществления первая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

[0160] Любой из антигенсвязывающих доменов, антител и фрагментов антител по настоящему изобретению (например, как описано выше в разделе I) может найти применение в способах идентификации полиспецифических (например, биспецифических) антител и фрагментов антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены, антитела и фрагменты антител связываются с дектином-1 человека. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связывается с дектином-1 человека и связывается с mSA через линкер. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент включают последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:15-17.

[0161] Анализы для измерения связывания между полиспецифической связывающей молекулой и по меньшей мере одной из первой и второй представляющих интерес мишеней известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления связывание между полиспецифической связывающей молекулой и очищенным антигеном измеряют, например, с помощью анализа связывания ИФА или ППР. В некоторых вариантах осуществления связывание между полиспецифической связывающей молекулой и клеткой, экспрессирующей антиген на своей поверхности, измеряют, например, с помощью анализа связывания на основе проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления измеряют связывание между полиспецифической связывающей молекулой и частицей или другим твердым субстратом, покрытым антигеном. В некоторых вариантах осуществления функциональный анализ используется для выявления взаимодействия между двумя или более клетками (каждая из которых экспрессирует поверхностный антиген, связанный антигенсвязывающим доменом полиспецифической связывающей молекулы), объединенными путем связывания

полиспецифической связывающей молекулы, например, путем измерения выработки цитокинов, гибели клеток/фагоцитоза и т. д.

III. Способы применения

[0162] В определенных аспектах в настоящем изобретении предложены способы лечения заболевания или нарушения, включающие введение эффективного количества антитела, фрагмента антитела, полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекулы или композиции по настоящему изобретению нуждающемуся в этом индивиду. В некоторых вариантах осуществления индивид является человеком.

[0163] Любой из антигенсвязывающих доменов, антител и фрагментов антител по настоящему изобретению (например, как описано выше в разделе I) может найти применение в способах лечения и применениях, описанных в данном документе, а также в композициях (например, фармацевтических композициях) связанных с ним. Например, в некоторых вариантах осуществления способы включают применение полиспецифической (например, биспецифической) связывающей молекулы по настоящему изобретению с первым антигенсвязывающим доменом, который связывается с дектином-1 человека, и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с патогенным агентом. В некоторых вариантах осуществления патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат (например, бета-амилоид или амилоид легкой цепи лямбда или каппа), частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса. В некоторых вариантах осуществления представляющая мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR. Связывание молекулы, которая опосредует целенаправленное удаление патогенного агента посредством фагоцитоза, может быть с авидностью и без нее, т. е. с индукцией и без индуцирования димеризации рецептора фагоцитоза, такого как дектин-1 или антиген-мишень, присутствующий в агенте.

[0164] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, вирусную инфекцию, мастоцитоз или болезнь тучных клеток, системный мастоцитоз, амилоидоз или связанное со старением заболевание или нарушение. Существует множество накопленных и не подвергшихся клиренсу аберрантных клеток-хозяев, таких как опухолевые, лимфомные, мертвые, некротические, апоптотические, умирающие, инфицированные, поврежденные клетки, которые связаны с заболеваниями. Кроме того, различные клеточные продукты, такие как агрегированные белки (β -амилоидные бляшки, агрегаты тау-белка или амилоиды легких цепей лямбда или

каппа), липопротеиновые частицы, могут вызывать заболевание при повышенном накоплении. Патогенная клетка может иметь гликопротеин, поверхностный белок или гликолипид, типичные для аберрантных клеток, связанных с заболеванием, нарушением или другим нежелательным патологическим состоянием. Помимо агентов, продуцируемых хозяином, различные чужеродные патогены, такие как инфекционные микробы (например, вирусы, грибки и бактерии), а также продукты и остатки микробов (например, оболочки вирусных частиц, эндотоксины) могут плохо поддаваться клиренсу у пациентов. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой вирус гриппа. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой SARS-CoV-2.

[0165] Вышеперечисленные отклонения от нормы могут вызывать такие заболевания, как злокачественное новообразование, болезнь Альцгеймера, фиброз, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, ВИЧ, гепатит А, В или С, сепсис и т. д. Многие из этих нарушений или заболеваний характеризуются накоплением патогенных агентов в различных органах человека. Помимо полезного удаления патогенных агентов посредством фагоцитоза, молекула может вызывать выработку медиаторов воспаления для изменения микроокружения болезни, например, при опухолях, злокачественных новообразованиях и лимфомах. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что молекула, обеспечивающая направленный фагоцитоз, может демонстрировать явные преимущества для пациентов с такими заболеваниями, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, злокачественное новообразование, инфекционные заболевания (вирусные, бактериальные, грибковые, протозойные инфекции), воспалительные или иммунные заболевания (например, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз), дегенеративные заболевания (например, суставов и хрящей), ревматоидный артрит, синдром Фелти, агрессивный NK-клеточный лейкоз, идиопатическая воспалительная миопатия, ВЗК и т. д. Кроме того, лечение антителами для направленного фагоцитоза может иметь лучшую активность по истощению клеток в тканях по сравнению с АЗКЦ, основанным на NK-клетках. Лечение может иметь селективную активность по удалению конкретного патогенного агента по сравнению с терапией, которая нацелена на миелоидные клетки и улучшает фагоцитоз в целом. Например, мишени, представляющие интерес для лечения злокачественного новообразования, включают, без ограничения, CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 и EGFR.

[0166] Следующее описание представлено для того, чтобы позволить специалисту в данной области техники создавать и использовать различные варианты осуществления. Описания конкретных устройств, методик и применений приведены только в качестве примеров. Различные модификации примеров, описанных в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники, и определенные в данном документе общие принципы могут быть применены к другим примерам и применениям без отступления от сущности и объема различных вариантов осуществления. Таким образом, различные варианты осуществления не предназначены для ограничения описанными в

данном документе и показанными примерами, но должны соответствовать объему, соответствующему формуле изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Функциональная характеристика антитела к дектину-1 2M24

[0167] В этом примере описано получение моноклональных антител, специфичных к дектину-1 человека. В этом примере также описана характеристика нового антитела к дектину-1 человека.

Материалы и способы

Получение антител к дектину-1

[0168] Четырехнедельных трансгенных мышей АТХ-Gx иммунизировали подкожно рекомбинантной изоформой В дектина-1 человека в течение пяти недель с одной бустерной дозой антигеном в неделю. Титры антител в сыворотке мышей оценивали до и после бустерной дозой с помощью ИФА и проточной цитометрии. Мышей с самым высоким титром антител в сыворотке отбирали в качестве источника В-клеток для получения гибридом.

[0169] Перед слиянием клеток мышам вводили одну дополнительную дозу рекомбинантной изоформы В дектина-1 человека. Мышей умерщвляли и отбирали селезенки. Клетки селезенки и клетки миеломы SP2/0-Ag14 смешивали, после чего индуцировали слияние путем инкубации при 37°C и в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) или путем электропорации. Затем клетки собирали и высевали в 96-луночные планшеты с ограниченным разведением, чтобы получить одну клетку на лунку. Затем клетки обрабатывали средой с гипоксантином, аминоптерином и тимидином (НАТ) и подвергали селекции в течение более 2 недель в культуре.

[0170] Для идентификации кандидатов, специфичных в отношении дектина-1 супернатанты гибридомы подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии на клетках, сверхэкспрессирующих дектин-1, и первичных моноцитах человека. Перекрестную реактивность дектина-1 у яванских макаков оценивали по связыванию антител с первичными моноцитами яванских макаков с использованием проточной цитометрии.

Образцы здоровых доноров

[0171] Свежие лейкоцитарные пленки здоровых доноров были получены из Стэнфордского центра крови. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли с помощью разделения, основанного на использовании градиента плотности Ficoll-Paque, (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс) и криоконсервировали в среде для замораживания клеток Vambanker (Bulldog Bio, Портсмут, штат Нью-Хэмпшир). Вкратце, лейкоцитарную пленку разводили в фосфатно-солевом буфере (в соотношении 1:1), затем разбавленную лейкоцитарную пленку наслаивали в фиколле и центрифугировали при 760 g. Слой РВМС выделяли и промывали в PBS перед дальнейшим анализом. Лейкоциты периферической крови выделяли посредством лизиса эритроцитов. Криоконсервированные РВМС яванского макака получали от Human Cells Biosciences.

Первичные клетки и культура клеток

[0172] Моноциты человека выделяли из PBMC здоровых доноров в соответствии с инструкциями производителя набора для выделения пан-моноцитов (Miltenyi Biotec, Inc., Оберн, штат Калифорния). Для дифференцировки макрофагов и дендритных клеток моноциты культивировали в среде RPMI с 10 мкл сыворотки человека (Millipore Sigma) в присутствии 50 нг/мл MCSF (Peprotech, Роки-Хилл, штат Нью-Джерси) в течение 6 дней для полной дифференциации в макрофаги или в присутствии 50 нг/мл GM-CSF и 50 нг/мл IL-4 (Peprotech, Роки-Хилл, штат Нью-Джерси) в течение 6 дней, чтобы полностью дифференцироваться в дендритные клетки. Среду с цитокинами обновляли каждые 3 дня.

[0173] Клетки НЕК Blue hDectin-1-a и клетки НЕК Blue hDectin-1-b (Invivogen, Сан-Диего, штат Калифорния) поддерживали в среде DMEM/10% FBS с добавлением морфоцина и пурамицина в соответствии с инструкциями производителя. Клетки Freestyle 293F транзистентно трансфицировали в соответствии с рекомендациями производителя (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). Вкратце, определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки разводили до конечной плотности 11×10^6 жизнеспособных клеток/мл средой для экспрессии Freestyle 293. Реагент Freestyle Max разбавляли средой OptiPro SFM, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Разбавленный реагент Freestyle Max добавляли к плазмидной ДНК, разведенной средой OptiPro SFM, и перемешивали. Комплексы реагент Freestyle Max/плазмидная ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 10-20 минут. Комплексы медленно переносили в клетки, слегка вращая культуральную колбу во время добавления, и затем клетки инкубировали в инкубаторе при 37°C с относительной влажностью 80% и 8% CO₂ на орбитальном шейкере.

Связывание антител к дектину-1 с клетками, экспрессирующими дектин-1

[0174] Клетки, экспрессирующие дектин-1, (НЕК Blue hDectin-1-a, НЕК Blue hDectin-1-b, НЕК293F hDectin-1 a FL, моноциты человека или моноциты яванского макака) высевали в количестве 1×10^5 - 2×10^5 клеток на лунку в необработанные для тканевой культуры 96-луночные планшеты с V-образным дном. Кроме того, человеческие моноциты инкубировали в человеческом FcγR-блокирующем антителе (Biolegend, Сан-Диего, штат Калифорния) в течение 10 минут при комнатной температуре для уменьшения связывания антител с Fc-рецептором. Затем клетки окрашивали красителем для определения жизнеспособности eFluor 506 (ThermoFisher, Уолтем, штат Массачусетс) в разведении 1:1000 в течение 30 минут на льду с последующей стадией промывки в буфере для FACS (PBS с 2% фетальной бычьей сыворотки). Первичные антитела к дектину-1 или изотипы использовали при титровании 300, 100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23, 0,41 и 0,14 нМ и инкубировали на льду в течение 30 минут с последующей стадией промывки в буфере для FACS.

[0175] Для обнаружения мышинных первичных антител клетки инкубировали с флуоресцентно меченым AF647, специфичным к мышинному Fc вторичным антителом (Jackson Immuno). Для обнаружения первичных антител IgG4 человека клетки

инкубировали в течение 30 минут на льду с конъюгированным с Alexa Fluor 647 специфичным к человеческому Fc вторичным антителом (Jackson Immuno) (обнаружение в клетках НЕК) или конъюгированным с FITC антителом к IgG4 человека (Sigma) (обнаружение в первичных моноцитах). Сбор данных проводили с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, штат Джорджия) и анализировали с помощью Graphpad Prism 8.4.

Антитело к дектину-1 блокирует ламинарин

[0176] Клетки НЕК Blue hDectin-1a высевали в количестве 1×10^5 клеток на лунку в необработанных для тканевой культуры 96-луночных планшетах с V-образным дном. Первичные антитела к дектину-1 использовали при титровании 300, 100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23, 0,41, 0,14, 0,05, 0,015 и 0,005 нМ и инкубировали на льду в течение 30 минут в присутствии 8 мкг/мл модифицированного биотином ламинарина. После стадии промывки в буфере для FACS связывание модифицированного биотином ламинарина с клетками НЕК определяли с использованием стрептавидина-AF647 в течение 30 минут на льду. Для анализа 4000 клеточных событий были получены в проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, штат Джорджия) и проанализированы с использованием Graphpad Prism 8.4.

Мечение полистироловых частиц pHrodo и конъюгация с антителами

[0177] Полистироловые частицы разного размера, покрытые козьим антителом к IgG мыши (или биотином) (Spherotech, Лейк-Форест, штат Иллинойс), дважды промывали 0,05% PBS/Tween20. pHrodo Red, сукцинимидиловый эфир (pHrodo Red, SE) (ThermoFisher, Уолтем, штат Массачусетс) добавляли к частицам в концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре при встряхивании. Затем частицы промывали 0,1% PBS/BSA для удаления избытка pHrodo Red.

[0178] После мечения pHrodo антитело конъюгировали с частицами в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, исходя из связывающей способности частиц с антителом, к частицам добавляли 5-кратный избыток антитела и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут при встряхивании. Затем частицы промывали 0,1% PBS/BSA для удаления несвязавшегося антитела. Для оценки качества частиц активацию pHrodo red оценивали в буфере с низким pH с помощью проточной цитометрии. Антитело, связанное с частицами, оценивали с использованием флуоресцентно меченого AF647, специфичного к Fc мыши, или конъюгированного к FITC вторичного антитела к IgG4 человека.

Антителозависимый направленный фагоцитоз частиц, меченных Phrodo

[0179] Для экспериментов по фагоцитозу 50000 клеток НЕК, сверхэкспрессирующих дектин-1, или первичные клетки (макрофаги или дендритные клетки) высевали в 96-луночный планшет в RPMI с 10 FBS со сверхнизким содержанием IgG. Меченные с pHrodo частицы, конъюгированные с антителами к дектину-1 или изотипами, добавляли в желаемом соотношении в пределах от 1:1 до 1:3 клетки: частицы, и планшеты кратковременно центрифугировали.

[0180] В некоторых экспериментах для мечения клеток добавляли средство отслеживания клеток кальцеин АМ (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). Фагоцитоз отслеживали в системе визуализации живых клеток IncuCyte S3 (Германия) путем получения изображений в нужные моменты времени и анализа с использованием программного обеспечения IncuCyte S3. Фагоцитоз количественно оценивали по перекрытию ярко-красной флуоресценции (поглощенные частицы) с кальцеин АМ-положительными клетками или интегральной интенсивности ярко-красной флуоресценции.

Анализ репортера SEAP в клетках НЕК, сверхэкспрессирующих дектин-1, с антителами к дектину-1

[0181] Моноклональные антитела к дектину-1 2M24 (домены VH и VL, содержащие SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно) или 15E2 и контрольные изотипы иммобилизовали путем нанесения на поверхность лунок необработанных 96-луночных полипропиленовых титрационных микропланшетов с U-образным дном. Для покрытия в каждую лунку добавляли 10, 2, 1, 0,5 и 0,1 мкг антитела к дектину-1, разведенного в 50 мкл стерильного PBS. Планшеты оставляли на ночь в ламинарном шкафу класса II со снятыми крышками для испарения растворов. Планшеты с покрытием дважды промывали 200 мкл стерильного PBS для удаления кристаллов соли и несвязавшегося антитела. Затем клетки НЕК Blue hDectin-1-а культивировали в планшетах со средой RPM1 с 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG (VWR) в течение 22 часов и определяли уровни щелочной фосфатазы в супернатанте при оптической плотности 630 нм с использованием раствора QUANTI Blue (Invivogen, Сан-Диего, штат Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя.

[0182] Для определения секреции SEAP клетками НЕК, индуцированной частицами, конъюгированными с антителом к дектину-1, стрептавидин-2M24 (hIgG4) конъюгировали с полистироловыми частицами с биотином размером 3, 10 и 16 мкм (Spherotech, Лейк-Форест, штат Иллинойс) путем инкубации гранул с антителом в течение 30 минут при комнатной температуре и дважды промывали PBS для удаления несвязавшегося антитела. Частицы, конъюгированные с антителом к дектину-1, смешивали с 1×10^5 клеток НЕК Blue hDectin-1-а в соотношении 1:3 клетки: частицы в RPM1 с 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG в течение 22 часов с последующей оценкой щелочной среды. секреция фосфатазы при ОП 630 нм в супернатанте, как описано выше.

Секреция цитокинов

[0183] Моноклональные антитела к дектину-1, клоны 2M24 или 15E2 и контрольные изотипы иммобилизовали нанесением 10 мкг на поверхности лунок необработанных 96-луночных полипропиленовых титрационных микропланшетов с U-образным дном, как описано выше. Свежевыделенные моноциты или мононуклеарные клетки периферической крови затем культивировали на планшетах с иммобилизованными антителами в RPM1 с 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG при 200000 клеток/лунка

в течение 24 часов. В других лунках клетки обрабатывали 10 мкг/мл антител к дектину-1 в растворе вместо иммобилизованных антител. TNF α , IL-6 и IFN γ в супернатанте оценивали с использованием платформы анализа U-PLEX (Meso Scale Discovery), и их уровни выражали как кратное изменение секреции цитокинов, индуцированной антителом к дектину-1, по сравнению с изотипическим контролем. В качестве положительного контроля клетки стимулировали зимозаном в концентрации 25 мкг/мл.

Результаты

[0184] Для получения антител к дектину-1 четырехнедельных трансгенных мышей ATX-Gx от Alloу иммунизировали подкожно рекомбинантным белком изоформы В дектина-1 с одной бустерной дозой антигена в неделю. Антитела, полученные в результате этой иммунизации, имеют человеческий вариабельный домен человека и мышинный константный домен.

[0185] Из 56 клонов антител-кандидатов к дектину-1, созданных в этом исследовании, клон 2M24 был единственным, который показал связывание с обеими изоформами дектина-1 А и В в клетках НЕК, а также с моноцитами. Как показано на **Фиг. 1А**, клон антитела к дектину-1 2M24 продемонстрировал высокую аффинность к моноцитам человека, экспрессирующим дектин-1. Напротив, другие клоны связывались только с изоформой А дектина-1 (например, 2M08, 2M12, 2M38) или вообще не связывались (2M49). Более того, аффинность 2M24 к дектину-1 была выше, чем аффинность других клонов и коммерческих антител к дектину-1 (15E2, 259931, GE2). На **Фиг. 1С** показано сравнение связывания с моноцитами человека и клетками НЕК, сверхэкспрессирующими дектин-1, между клоном 2M24 и другими клонами к дектину-1, идентифицированными в результате иммунизации трансгенных мышей Alloу, а также коммерческими клонами к дектину-1.

[0186] Антитело 2M24 также оценивали на его перекрестную реактивность с дектином-1 яванского макака. Связывание оценивали с помощью анализа моноцитов яванского макака, полученных из РВМС, на основе проточной цитометрии. Как показано на **Фиг. 1В**, клон антитела к человеческому дектину-1 2M24 продемонстрировал перекрестную реактивность и высокую аффинность к дектину-1 яванского макака, экспрессированному на моноцитах. Антитело к дектину-1 2M24 превосходило коммерческие антитела, протестированные с точки зрения аффинности, демонстрируя EC50 0,3 нМ. Коммерческие агонистические антитела 15E2 и 259931 показали EC50 14 нМ и 16 нМ, соответственно, в моноцитах яванского макака. На **Фиг. 1С** показано сравнение связывания с моноцитами яванского макака между клоном 2M24 и коммерческими клонами 15E2 и 259931.

[0187] Для оценки функциональности антитела к дектину-1 2M24 в стимулировании фагоцитоза полистироловые частицы покрывали антителом 2M24 и смешивали с клетками НЕК-Blue hDectin-1a или первичными моноцитами человека. Антитело 2M24 эффективно индуцировало фагоцитоз частиц. Как показано на **Фиг. 2А-2В**, антитело к дектину-1 2M24, связанное с полистироловыми частицами, стимулировало

фагоцитоз как в клетках НЕК-Blue hDectin-1a, так и в первичных моноцитах человека.

[0188] Из клона mIgG1 2M24 было получено полностью человеческое антитело 2M24 изотипа IgG4. Это антитело имеет человеческие константную и переменную области. Затем оценивали функциональность hIgG4 2M24 по связыванию с двумя типами клеток, экспрессирующих дектин-1, клетками НЕК-Blue hDectin-1a и моноцитами человека. Как показано на **Фиг. 3А-3В**, полностью человеческий 2M24 показал высокую аффинность связывания с дектином-1 в трансфицированных клетках НЕК ($EC_{50}=1,6$ нМ) и моноцитах человека ($EC_{50}=0,7$ нМ).

[0189] Затем антитело 2M24 hIgG4 тестировали на его способность стимулировать фагоцитоз частиц клеток, экспрессирующих дектин-1. Как показано на **Фиг. 4**, антитело 2M24 hIgG4 проявляло эффективную фагоцитарную способность в клетках НЕК, сверхэкспрессирующих дектин-1, человеческих моноцитах и макрофагах человека. Таким образом, полностью человеческое антитело IgG4 2M24 может способствовать фагоцитозу в клетках, экспрессирующих дектин-1.

[0190] Полностью человеческое антитело 2M24 (hIgG4) к дектину-1 также тестировали на его способность стимулировать сигналинг через дектин-1. Активацию сигналинга дектина-1 антителами можно оценить с помощью анализа секретируемой щелочной фосфатазы с использованием клеток НЕК-Blue hDectin-1a. Клетки НЕК-Blue hDectin-1a были сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать изоформу А дектина-1 и гены, участвующие в сигнальном пути дектин-1/NF- κ B/SEAP, и, таким образом, экспрессировать секретируемую щелочную фосфатазу (SEAP) в ответ на стимуляцию лигандами дектина-1. Как показано на **Фиг. 5А-5В**, антитело к дектину-1 2M24 (hIgG4) индуцировало секрецию щелочной фосфатазы в клетках НЕК-Blue hDectin-1a как в иммобилизованной форме, так и в конъюгированной с частицами форме. Эти наблюдения подтверждают идею о том, что антитело 2M24 (hIgG4) способствует секреции SEAP, взаимодействуя с дектином-1 на поверхности клеток, что указывает на кластеризацию рецептора и агонистическую активность этого антитела. Более того, эффективному сигналингу дектина-1 посредством кластеризации можно способствовать с помощью частиц, конъюгированных с 2M24 (hIgG4). Сигналинг лучше индуцировался более крупными частицами, что отражало лучшую кластеризацию рецептора. Это подтверждает, что кластеризация дектина-1, стимулируемая биспецифическим антителом, содержащим антитело к дектину-1, которое нацелено на фагоцит, и антитело, нацеленное на другую клетку, такую как раковая клетка, может способствовать кластеризации и сигналингу дектина-1 на фагоците.

[0191] Природные лиганды дектина-1 объединяются с рецептором и передают сигнал ниже от дектина-1/Syk/NF κ B, вызывая экспрессию воспалительного гена. Чтобы оценить, может ли взаимодействие антитела к дектину-1 в растворе инициировать секрецию цитокинов, моноциты или макрофаги обрабатывали 10 мкг/мл коммерческого антитела к дектину-1. Как показано на **Фиг. 6А-6В**, коммерческое антитело к дектину-1 15E2 не индуцировало секрецию цитокинов в первичных макрофагах и моноцитах

человека, что указывает на недостаточную кластеризацию рецептора дектина-1. Эти данные подтверждают, что свободное антитело к дектину-1 в растворе не вызывает иммуностимуляцию из-за отсутствия достаточной кластеризации дектина-1.

[0192] Для оценки того, может ли секреция цитокинов индуцироваться антителом к дектину-1 2M24 (hIgG4), антитело иммобилизовали на частицы и культивировали с моноцитами или РВМС. Как показано на **Фиг. 7А-7В**, антитело к дектину-1 2M24 индуцировало секрецию цитокинов первичными человеческими моноцитами и РВМС. Антитело 2M24 не только стимулировало секрецию цитокинов, но также демонстрировало превосходную иммуностимуляцию по сравнению с иммуностимуляцией, стимулируемой агонистическим антителом к дектину-1 15E2. Из цитокинов, измеренных в этом эксперименте, TNF α и IL6 секретируются моноцитами, экспрессирующими дектин-1. Напротив, IFN γ в основном секретируется Т-клетками, которые относятся к РВМС. Поскольку Т-клетки не экспрессируют дектин-1, они активируются не непосредственно антителами к дектину-1, а цитокинами, секретируемыми моноцитами в РВМС, которые стимулируются антителами к дектину-1. Дифференциальный эффект антител к дектину-1 на IFN γ , таким образом, был более заметным в РВМС, чем в чистых моноцитах.

[0193] Наконец, исследовали активацию дектина-1 природными лигандами в присутствии антитела к дектину-1. Клетки НЕК-Blue hDectin-1a инкубировали в 1/3 серийном титровании дозы антитела к дектину-1 2M24 (hIgG4) или коммерческих антител к дектину-1 15E2, 259931, GE2, начиная с 300 нМ в присутствии 8 мкг/мл биотинилированного ламинарина. Как показано на **Фиг. 8**, связывание антитела 2M24 (hIgG4) с дектином-1 не блокирует связывание ламинарина, природного лиганда дектина-1. Таким образом, взаимодействие дектина-1 с антителом к дектину-1 2M24 не блокирует клиренс патогенов и вряд ли увеличивает восприимчивость к потенциальным грибковым инфекциям.

[0194] В заключение, антитело к дектину-1 2M24 может индуцировать фагоцитоз клетками, экспрессирующими дектин-1, и может индуцировать активацию сигналинга дектина-1, не конкурируя с природными лигандами для дектина-1. Свойства антител 2M24 и 15E2 приведены на **Фиг. 9**.

Пример 2: Биспецифические антитела к дектину-1

[0195] В этом примере описано создание и характеристика биспецифических антител, содержащих плечо, связывающее дектин-1, и второе плечо, которое связывает специфические опухолевые антигены.

Материалы и способы

Получение биспецифических молекул

[0196] Антитела были дифференцированно помечены реагентом МТА или FOL в соответствии с рекомендациями производителя (AAT Bioquest). Меченые антитела смешивали и инкубировали, чтобы обеспечить ковалентную сборку за счет взаимодействия МТА и FOL. Для биотина использовали следующие антитела:

стрептавидин-индуцированные биспецифические антитела:

Слитый белок тяжелая цепь антитела к дектину-1 15E2: mSA

QWQLQQSGAELARPGASWKMSCASGYTFTTYTMHWWKQRPQGLEWIGYIN
PSSGYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTASMQSSLTSEDSAWYYCARERAVLVPYAMDY
WGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVGGGSGGGSG
GGSEFASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRY
NGTKLEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEKGGSPATEQGGQ
DTFTKVKPSAASGSAAAGASHHHHHH (SEQ ID NO:18)

Легкая цепь антитела к дектину-1 15E2

QIVLTQSPAVMSASPGEKWTITCTASSSLSYMHWFFQKPGTSPKLWLYSTSILAS
GVPTFRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSSPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:19)

Меченная авидином тяжелая цепь Fab к CD20 (домен CH1 на основе последовательности hIgG4)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYP
GNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV
WGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVAAAGASHH
HHHHGSLNDIFEAKIEWHE (SEQ ID NO:20)

Легкая цепь Fab к CD20

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQKPGSSPKPWIYATSNLASG
VPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:21)

Меченная авидином тяжелая цепь Fab к HER2 (домен CH1 на основе последовательности hIgG4)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVAAAGASHHHH
HHGSLNDIFEAKIEWHE (SEQ ID NO:22)

Легкая цепь Fab к HER2

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLY
SGVPSRFRSGRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:23)

Анализ связывания клеток

[0197] Клетки, экспрессирующие дектин-1, метили кальцеином зеленым, а клетки-

мишени метили кальцеином красным. Клетки инкубировали в присутствии биспецифического или изотипического контрольного антитела, затем анализировали с помощью проточной цитометрии. На связывание клеток указывал двойной положительный сигнал (зеленый+красный+). Эффективность связывания количественно определяли как процент от общего числа клеток-мишеней, которые образуют дублеты с клетками, экспрессирующими дектин-1.

[0198] Пять миллионов эффекторных (экспрессирующих дектин-1 клеток) или клеток-мишеней (клеток, экспрессирующих представляющую интерес мишень, например, CD20-положительные клетки Raji или HER2-положительные клетки SKBR3) дифференциально метили либо кальцеином зеленым (0,5 нМ), либо кальцеином красным/pHrodo-red (0,5 нМ). Клетки тщательно промывали PBS и хранили на льду. Затем эффекторные клетки и клетки-мишени совместно культивировали в соотношении 3:1 (эффектор:мишень) в присутствии биспецифического антитела 2M24 или изотипического контроля и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. После инкубации образцы осторожно ресуспендировали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Напряжения ФЭУ регулировали соответствующим образом, и клетки гейтировали на основании флуоресценции FITC и/или PE, соответствующей флуоресценции зеленого или красного кальцеина. Эффективность связывания представлена как количество PE-положительных клеток (клеток-мишеней) в популяции дублетов, деленное на общее количество PE-положительных клеток-мишеней в реакции.

Анализ репортера SEAP в клетках НЕК, сверхэкспрессирующих дектин-1, с антителами к дектину-1

[0199] Для определения секреции SEAP клетками НЕК, индуцированной клетками Raji (экспрессирующими CD20), клетки Raji покрывали биспецифической молекулой 2M24/анти-hCD20 или hIgG4/анти-CD20 в течение 30 минут на льду с последующим двукратным промыванием PBS для удаления несвязавшегося биспецифической молекулой. Покрытые биспецифической молекулой клетки Raji смешивали с 1×10^5 клеток НЕК Blue hDectin-1-a в соотношении 1:2 (клетки НЕК Raji) в RPM1 с 10% FBS со сверхнизким содержанием IgG. Через 22 часа секрецию щелочной фосфатазы в супернатанте оценивали при оптической плотности 630 нм, как описано в Примере 2.

Результаты

[0200] Агонистические биспецифические антитела к дектину-1 могут использовать различные способы активности (например, иммунную активацию, фагоцитоз, презентацию неоантигена и активацию адаптивного иммунитета) для целенаправленного истощения раковых клеток (**Фиг. 11А-11В**). В качестве подтверждения концепции взаимодействия антитела к дектину-1 (15E2 или 2M24) и антитела-мишени был использован метод клик-химии для разработки биспецифических молекул, включающих плечо, нацеленное на дектин-1, и второе плечо, нацеленное на представляющий интерес белок. Этот подход позволил получить биспецифические молекулы для различных анализов. Схема этого подхода показана на **Фиг. 10А-10В**. Поскольку связывание

дектина-1 с дектин-1-специфическими антителами может индуцировать фагоцитоз мишеней (см. Пример 1 и Пример 2), биспецифические антитела оценивали на их способность стимулировать фагоцитоз специфических клеток-мишеней. Во-первых, биспецифические молекулы оценивали на их способность уничтожать раковые клетки, экспрессирующие CD70, путем фагоцитоза. CD70 представляет собой трансмембранный гликопротеин типа II, принадлежащий к суперсемейству фактора некроза опухоли (TNF). CD70 экспрессируется на низких уровнях в нормальных тканях, но сверхэкспрессируется при различных заболеваниях, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), почечно-клеточную карциному, ревматоидный артрит и волчанку.

[0201] С использованием клик-химии получали биспецифическую молекулу, содержащую плечо, нацеленное на дектин-1, (анти-дектин-1; клон 2M24) и плечо, нацеленное на CD70, (анти-hCD70; клон 113-16). Чистоту биспецифической молекулы (2M24/анти-hCD70) оценивали с помощью анализа методом ДСН-ПААГ-электрофореза (**Фиг. 12А**), а связывание оценивали с помощью анализа методом проточной цитометрии (**Фиг. 12В**). Как показано на **Фиг. 12В**, исследования связывания на клетках показали, что 2M24/анти-hCD70 связывается с линией клеток НЕК293, экспрессирующей дектин-1, с EC50, равной 1,8 нМ, и связывается с CD70-положительными линиями клеток почечной карциномы, с EC50, равной 12,34 нМ (клетки А498), или 11,62 нМ (клетки 786-0). Биспецифическую молекулу затем оценивали на его способность индуцировать связывание клеток. Как показано на **Фиг. 13**, биспецифическая молекула 2M24/анти-hCD70 индуцирует связывание клеток НЕК293, экспрессирующих дектин-1, и клеток карциномы почки, экспрессирующих CD70, что приводит к образованию дублетов клеток НЕК293 (помеченных кальцеином зеленым) и клеток А498 (помеченных кальцеином красным).

[0202] Затем оценивали нацеливание на клетки, экспрессирующие CD20, с помощью биспецифической молекулы. CD20 является трансмембранным белком, присутствующим практически на всех В-клетках, начиная со стадии, на которой они становятся коммитированными для развития В-клеток, до тех пор, пока его экспрессия не снижается, когда они дифференцируются в секретирующие антитела плазматические клетки, и считается пан-В-клеточным антигенным маркером. Как показано на **Фиг. 14А-14В**, биспецифическая молекула 2M24/анти-hCD20 индуцирует связывание клеток, экспрессирующих дектин-1 (как клеток НЕК293, экспрессирующих дектин-1, так и макрофагов М0 человека) с В-клетками, экспрессирующими CD20, (линия клеток Raji). Это межклеточное связывание, опосредованное биспецифической молекулой, может индуцировать образование синапсов между эффектором и клеткой-мишенью, что может изменить сигналинг цитокинов, активировать фагоцитоз и, в конечном итоге, способствовать презентации антигена.

[0203] Для проверки индукции сигналинга в результате стимуляции биспецифическими антителами, которые связывают дектин-1, был проведен анализ секретируемой щелочной фосфатазы. Как показано на **Фиг. 15**, клетки Raji, покрытые

биспецифической молекулой к дектину-1/CD20, индуцировали секрецию щелочной фосфатазы в клетках НЕК-Blue hDectin-1a. Таким образом, использование биспецифического антитела для соединения клетки-мишени с клеткой, экспрессирующей дектин-1, (такой как фагоцит) может способствовать сигналингу со стороны клетки, экспрессирующей дектин-1. В случае фагоцитов сигналинг может приводить к продукции цитокинов и иммуностимуляции.

[0204] Ранее было продемонстрировано, что экспрессия дектина-1 в клетках НЕК 293 необходима и достаточна для индуцирования фагоцитоза частиц различного размера, покрытых антителом, нацеленным на дектин-1, (см. Пример 1 и Пример 2). Для демонстрации фагоцитоза живых клеток-мишеней была разработана биспецифическая молекула, содержащая плечо, нацеленное на дектин-1, и плечо, нацеленное на CD20. В анализе совместного культивирования клеток НЕК 293 и CD20-экспрессирующих клеток Raji наблюдали фагоцитоз в клетках, обработанных биспецифической молекулой к дектину-1/hCD20, в отличие от биспецифического антитела изотипического контроля (**Фиг. 16**). Кроме того, предварительная инкубация клеток с латрункулином А, ингибитором фагоцитоза, блокирующим полимеризацию актина, блокировала фагоцитоз клеток, обработанных биспецифической молекулой к дектину-1/hCD20. Эти данные демонстрируют, что экспрессии дектина-1 достаточно, чтобы вызвать фагоцитоз, и что совместного нацеливания дектина-1 и представляющей интерес мишени с агонистической биспецифической молекулой к дектину-1 достаточно, чтобы вызвать фагоцитоз клетки-мишени.

[0205] Эксперимент для проверки концепции был проведен для совместного нацеливания на клетки, экспрессирующие дектин-1, и клетки HER2-положительного рака молочной железы с использованием биспецифического антитела к дектину-1/HER2. Приблизительно от 20% до 25% инвазивных злокачественных новообразований молочной железы демонстрируют сверхэкспрессию тирозинкиназного рецептора эпидермального фактора роста человека HER2. Как показано на **Фиг. 17**, биспецифическая молекула к дектину-1 (15E2)/HER2 индуцирует связывание клеток, экспрессирующих дектин-1 и HER2. Считается, что это взаимодействие способствует образованию синапсов между эффекторными клетками и клетками-мишенями, поскольку кластеризация дектина-1 индуцирует секрецию цитокинов эффекторными клетками, инициирует фагоцитоз клеток-мишеней и приводит к презентации неоантигена и активации адаптивных иммунных клеток (В- и Т-клеток).

[0206] Наконец, также оценивали биспецифическая молекула к дектину-1 (2M24)/hCD94. Лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL) представляет собой редкое хроническое лимфопролиферативное заболевание линии дифференцировки Т-клеток и натуральных клеток-киллеров (NK). CD94/NKG2 представляет собой семейство рецепторов лектина С-типа, которые экспрессируются преимущественно на поверхности NK-клеток и в субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов. Как показано на **Фиг. 18**, биспецифическая молекула к дектину-1 (2M24)/hCD94 индуцирует связывание клеток,

экспрессирующих дектин-1, и клеток, экспрессирующих CD94. Таким образом, биспецифические антитела, которые связывают дектин-1, могут опосредовать связывание клеток, экспрессирующих дектин-1, с различными клетками-мишенями.

Пример 3: Получение биспецифических антител к дектину-1 с использованием стрептавидина-биотина.

[0207] В этом примере описывается биохимическая и функциональная характеристика биспецифических антител, которые связывают дектин-1, полученных с использованием конъюгации стрептавидина и биотина.

Материалы и способы

Получение биспецифических молекул

[0208] mSA был генетически слит либо с Fab 2M24, либо с полноразмерным 2M24. Химерные белки инкубировали с биотинилированными антителами-мишенями для получения биспецифических молекул, содержащих плечо, связывающее дектин-1, и второе плечо, связывающее представляющий интерес целевой рецептор или белок.

Полноразмерная последовательность 2M24, слитая с mSA:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIN
 PNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSGFYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE
 FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTL
 PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLT
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGSEFASAEAGIT
 GTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTKLEWRVEW
 NNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEGGSGPATEQGQDTFTKVKPSAASG
 S (SEQ ID NO:15)

Последовательность Fab 2M24, слитая с mSA:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWIN
 PNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSGFYWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVGGGSGGGSGGGSEF
 ASAEAGITGTWYNQHGSTFTVTAGADGNLTGQYENRAQGTGCQNSPYTLTGRYNGTK
 LEWRVEWNNSTENCHSRTEWRGQYQGGAEARINTQWNLTYEGGSGPATEQGQDTFTK
 VKPSAASGSAAAGASHNNNNH (SEQ ID NO:17)

Антителозависимый направленный фагоцитоз меченных Phrodo частиц

[0209] Антителозависимый направленный фагоцитоз меченных Phrodo частиц выполняли как описано в Примере 2. Для отслеживания фагоцитоза с помощью проточной цитометрии клетки НЕК, сверхэкспрессирующие дектин-1, инкубировали с частицами с биотином, конъюгированными с Fab 2M24-mSA, в течение 30 минут на льду или при 37°C в течение 30 минут с последующей промывкой дважды PBS. Фагоцитоз

оценивали путем обнаружения активированного Phrodo red в популяции дублетов клетки НЕК/частицы с помощью проточной цитометрии в канале PE с использованием проточного цитометра CytoFlex (Beckman Coulter, Атланта, штат Джорджия).

Результаты

[0210] Для обеспечения эффективной генерации биспецифических антител, была разработана новая стратегия, в которой используется высокоаффинное взаимодействие стрептавидина и биотина. Конструкцию мономерного стрептавидина (mSA) сливали с доменом Fc 2M24 или доменом CH1 Fab 2M24. Рекомбинантные слитые белки инкубировали с различными представляющими интерес биотинилированными антителами для сборки биспецифических молекул. Схема этой стратегии показана на **Фиг. 19А-19В**.

[0211] Эта технология слияния обеспечивает высокопроизводительную генерацию и скрининг биспецифических антител. Для проверки этого подхода был создан и очищен слитый белок Fab 2M24-mSA. Как показано на **Фиг. 20А-20С**, слитый белок Fab 2M24-mSA показал высокую аффинность связывания ($EC_{50}=1,45$ нМ) с клетками, экспрессирующими дектин-1. Этот слитый белок Fab 2M24-mSA можно комбинировать с различными биотинилированными антителами к представляющим интерес мишеням. Более того, слитый белок Fab 2M24-mSA также индуцировал связывание и фагоцитоз частиц клетками НЕК 293, экспрессирующими дектин-1 (**Фиг. 21А-21В**), что указывает на то, что Fab-версия антитела 2M24 может эффективно стимулировать фагоцитоз клетками, экспрессирующими дектин-1.

[0212] Используя слитый белок анти-дектин-1-стрептавидин, были разработаны биспецифические молекулы против различных мишеней (например, CD20, CD19, CD70, амилоида В (1-42)). Как показано на **Фиг. 22А-22D**, эти биспецифические молекулы показали высокую гомогенность на основании анализа ВЭЖХ. Эти данные демонстрируют реальную возможность применения этой технологии для получения биспецифических антител.

[0213] Затем биспецифические молекулы к дектину-1, полученные с использованием слитого белка Fab 2M24-mSA, оценивали на их способность индуцировать связывание клеток. Как показано на **Фиг. 23**, биспецифическая молекула Fab 2M24-mSA/биотинилированное анти-hCD20 индуцировала связывание клеток НЕК293, экспрессирующих дектин-1, и В-клеток, экспрессирующих CD20, (линия клеток Raji). Это взаимодействие может способствовать кластеризации дектина-1, что индуцирует секрецию цитокинов эффекторными клетками, инициирует фагоцитоз клеток-мишеней и приводит к презентации неоантигена и активации адаптивных иммунных клеток (В- и Т-клеток).

Пример 4. Направленный фагоцитоз амилоидных отложений с использованием биспецифических антител к дектину-1

[0214] В этом примере описано применение биспецифических антител, которые связывают дектин-1, при направленной доставке антигенов патогенов к фагоцитирующим клеткам.

[0215] Направленный фагоцитоз, индуцированный дектином-1, можно использовать для обеспечения клиренса амилоида за счет презентации антигена (например, моноцитами, макрофагами, дендритными клетками и нейтрофилами) и максимального истощения циркулирующих предшественников амилоида (свободных легких цепей) и депонированных амилоидных фибрилл. Направленный фагоцитоз основан на нацеливании биспецифического антитела на дектин-1 (с помощью 2M24) и AL-амилоиды (с помощью амилоид-реактивного антитела или антитела к сывороточному амилоидному белку P).

[0216] Для проверки этого подхода сначала демонстрируется рекрутирование или присутствие антигенпрезентирующих клеток в местах отложения амилоида. Популяции иммунных клеток в свежeweделенных, насыщенных амилоидами тканях пациентов с AL-амилоидозом фенотипируют. Определяют частоту антигенпрезентирующих клеток (например, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и дендритных клеток). Оценивают экспрессию дектина-1 на APC в тканях больных AL-амилоидозом.

[0217] Затем разрабатывают биспецифические антитела, содержащие дектин-1-связывающее плечо (например, клон 2M24) и амилоид-связывающее плечо (на основе внешних антител). Для исследований, подтверждающих концепцию, фагоцитоз AL-амилоидных фибрилл циркулирующими моноцитами, макрофагами, происходящими из моноцитов (дифференцированными *in vitro*), или макрофагами, полученными от пациентов (*in situ*), демонстрируется с биспецифическими антителами к дектину-1, приготовленными с внешними антителами (**Фиг. 24**). Начата кампания по обнаружению антител для выявления связывающих агентов с высокой аффинностью к амилоидным фибриллам или предшественникам амилоида, из которых полученные антитела будут использоваться для дальнейшей разработки биспецифических антител к дектину-1 для нацеливания на отложения амилоида.

Пример 5: Направленный фагоцитоз тучных клеток с использованием биспецифических антител к дектину-1

[0218] В этом примере описано применение биспецифических антител, которые связывают дектин-1, при направленной доставке антигенов патогенов к фагоцитирующим клеткам.

Материалы и способы

Анализ фагоцитоза частиц

[0219] Большие (~ 16,5 мкм) полистироловые частицы с антителом к Fc IgG мыши метили pH-чувствительным флуоресцентным красителем (pHrodo Red) и конъюгировали с антителом к дектину-1 или изотипическим контролем. Для анализа фагоцитоза частицы инкубировали с культивируемыми дендритными клетками в соотношении 1:3 (клетки: частицы). Фагоцитоз частиц контролировали с помощью визуализации живых клеток IncuCyte. Фагоцитоз количественно определяли с использованием программного обеспечения для анализа IncuCyte и выражали как общую интегрированную интенсивность (общую суммарную интенсивность флуоресценции) красных объектов

(флуоресценция pHrodo) на изображении.

[0220] Мастоцитоз характеризуется патологическим накоплением тучных клеток в одном или более органах. Учитывая тканевую природу тучных клеток и трудности с терапевтическим доступом к этим клеткам, присущие тканям макрофаги могут быть привлечены и задействованы для истощения и снижения патологических уровней тучных клеток. Как описано в Примере 1, взаимодействие с дектином-1 может способствовать фагоцитозу частиц с размером, близким к клеткам, включая тучные клетки. Таким образом, для направленного истощения тучных клеток можно применять платформу для направленного фагоцитоза, индуцированного дектином-1.

[0221] Во-первых, разрабатывают биспецифические антитела с плечом, нацеленным на макрофаги (через связывание с дектином-1), и плечом, нацеленным на тучные клетки (через поверхностный антиген тучных клеток), как показано на **Фиг. 25А**. Потенциальные поверхностные антигены/рецепторы тучных клеток, которые могут быть использованы в качестве перспективных кандидатов для разработки биспецифических молекул, приведены на **Фиг. 25В**. Эти биспецифические антитела затем оценивают на их способность связываться с тучными клетками и нацеливаться на них для фагоцитоза клетками, экспрессирующими дектин-1, и истощать тучные клетки пациента *in situ*. Фагоцитоз тучных клеток, дифференцированных *in vitro*, или линий тучных клеток макрофагами, происходящими из моноцитов (дифференцированными *in vitro*), или макрофагами, полученными от пациентов (*in situ*), демонстрируют с использованием биспецифических антител к дектину-1.

[0222] Присутствие или рекрутирование антигенпрезентирующих клеток (например, макрофагов, моноцитов, нейтрофилов и дендритных клеток) демонстрируют в тканях/органах пациента с большим количеством тучных клеток. Популяции иммунных клеток фенотипируют в свежих тканях, выделенных от пациентов с мастоцитозом. Экспрессию дектина-1 оценивают на АРС. Связывание внешних антител оценивают на донорских тучных клетках.

[0223] Учитывая большой размер тучных клеток, мы оценили, может ли дектин-1 способствовать фагоцитозу крупных объектов путем конъюгации антитела к дектину-1 с большими частицами (~ 16,5 мкм), которые по размеру аналогичны крупным клеткам. Поскольку макрофаги являются большими фагоцитирующими клетками и могут поглощать большие мишени, анализ фагоцитоза для больших частиц проводили с использованием макрофагов, дифференцированных из моноцитов, в присутствии MCSF в течение 6 дней. Как показано на **Фиг. 26**, антитело к дектину-1 способствовало направленному фагоцитозу больших частиц в культивируемых макрофагах человека. Частицы, конъюгированные с антителом к дектину-1, легче поглощались макрофагами по сравнению с частицами, конъюгированными с контрольным изотипом. Эти данные подтверждают, что нацеливание на дектин-1 позволяет нацеливаться на большие клетки, такие как тучные клетки (размер: 16-20 мкм), для фагоцитоза.

Пример 6: Направленное истощение микробов с использованием

биспецифических антител к дектину-1

[0224] В этом примере описано применение биспецифических антител, которые связывают дектин-1, при направленном фагоцитозе микробов.

Материалы и способы

Связывание с вирусом гриппа H3N2 с помощью ИФА

[0225] Для оценки связывания биспецифического антитела к дектину-1/гемагглютинуину с вирусом гриппа H3N2, частицы гриппа H3N2 в концентрации 2,5, 5 и 10 мкг/мл наносили на ночь на 96-луночные планшеты с высокой степенью связывания. Планшеты дважды промывали PBS, блокировали 3% BSA в PBS/Tween-20 0,05% в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим дополнительным промыванием PBS/Tween-20 0,05%. Первичные антитела, включая антитело к дектину-1 (15E2), антитело к гемагглютинуину (12CA5), биспецифическую молекулу к дектину-1/гемагглютинуину и изотипические контроли, инкубировали в концентрации 20 нМ в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты дважды промывали PBS/Tween-20 0,05% и инкубировали вторичное антитело к мышиному Fcγ:HRP в соотношении 1:5000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Наконец, планшеты промывали, инкубировали с субстратом TMB в течение 30 минут и реакцию останавливали 2 н. H₂SO₄. Планшеты считывали при 450 нм на планшет-ридере.

[0226] Врожденные иммунные клетки играют жизненно важную роль в распознавании и уничтожении микробных патогенов. Чтобы помочь фагоцитам атаковать бактерии, вирусы или грибковые патогены, биспецифическая молекула, содержащая плечо, нацеленное на дектин-1, которое связывает антигенпрезентирующие клетки (макрофаги, моноциты, дендритные клетки и нейтрофилы), и второе плечо, нацеленное на антиген, экспрессируемый на поверхности патогенов, можно использовать для направленного истощения, индуцированного дектином-1 (**Фиг. 27**). Направленный фагоцитоз патогенов позволяет эффекторным клеткам эффективно распознавать патоген-мишень и секретировать цитокины и протеазы, которые могут непосредственно убивать связанный патоген. Кроме того, биспецифическое антитело может опосредовать кластеризацию дектина-1, индуцируя направленный фагоцитоз связанной мишени. Наконец, после деградации мишени презентуются антигены-мишени, которые модулируют адаптивный иммунный ответ, что дополнительно позволяет организму хозяину бороться с патогеном.

[0227] В качестве проверки и подтверждения принципа действия идентифицируют высокоаффинные антитела против представляющих интерес патоген-специфических поверхностных антигенов и используют их для создания биспецифических антител, содержащих плечо, связывающее дектин-1 (антитело к дектину-1 2M24), и плечо, нацеленное на патоген. Биспецифические антитела к дектину-1/патогену тестируют на связывание с мишенью, секрецию цитокинов фагоцитами после взаимодействия с мишенью, фагоцитоз мишени и деградацию патогена и презентацию антигена-мишени. Кроме того, для проверки мишеней патогенов разрабатываются высокоаффинные

антитела, которые затем используются для разработки биспецифических антител к дектину-1 из перспективных кандидатов.

[0228] Для тестирования направленной доставки патогена к антигенам фагоцитирующих клеток было создано биспецифическое антитело с плечом, связывающим дектин-1, и вторым плечом, которое связывает гемагглютинин из вируса гриппа H3N2. Затем биспецифическое антитело к дектину-1/гемагглютинину тестировали на связывание с использованием как ИФА, так и проточной цитометрии. Как показано на **Фиг. 28А-28В**, биспецифическое антитело к дектину-1/гемагглютинину эффективно связывалось как с вирусом гриппа H3N2, так и с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1. Этот формат антител можно использовать для нацеливания вируса гриппа или антигена вируса гриппа на антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки, макрофаги).

Пример 7: Направленная доставка антигенов для разработки вакцин

[0229] В этом примере описана направленная доставка вирусных антигенов к фагоцитирующим клеткам.

Материалы и способы

Анализ фагоцитоза частиц

[0230] Малые (~ 3,4 мкм) полистироловые частицы с антителом к Fc IgG мыши метили pH-чувствительным флуоресцентным красителем (pHrodo Red) и конъюгировали с антителом к дектину-1 или изотипическим контролем. Для анализа фагоцитоза частицы инкубировали с культивируемыми дендритными клетками в соотношении 1:3 (клетки: частицы). Фагоцитоз частиц контролировали с помощью визуализации живых клеток IncuCyte. Фагоцитоз количественно определяли с использованием программного обеспечения для анализа IncuCyte и выражали как общую интегрированную интенсивность (общую суммарную интенсивность флуоресценции) красных объектов (флуоресценция pHrodo) на изображении.

Мечение полистироловых частиц pHrodo и конъюгация с антителами

[0231] Мечение полистироловых частиц pHrodo и конъюгацию с антителами выполняли как описано ранее.

[0232] Чтобы покрыть полистироловые частицы шиповидным белком S1 SARS-CoV-2, частицы с козым антителом к кроличьему IgG (Fc) (Spherotech) были помечены pHrodo Red и конъюгированы с кроличьим антителом к FLAG (Cell Signaling), как описано выше. Затем меченный FLAG шиповидный белок (Genscript) связывали с частицами с pHrodo/антителом к FLAG, а несвязанный шиповидный белок отмывали с помощью PBS.

Антителозависимый направленный фагоцитоз частиц, меченных Phrodo

[0233] Для фагоцитоза частиц, покрытых шиповидным белком SARS-CoV-2, частицы предварительно инкубировали с биспецифической молекулой к дектину-1/шиповидному белку SARS-CoV-2 (антитело к шиповидному белку SARS-CoV-2 было приобретено у Genscript) в течение 60 минут при комнатной температуре, а несвязанное

антитело отмывали. Затем частицы смешивали с клетками НЕК.

Результаты

[0234] Дендритные клетки являются специализированными антигенпрезентирующими клетками. Нацеливание антигена, экспрессируемого на патогенном агенте (раковой клетке, патогене или белковом агрегате), или самого агента на дендритные клетки через дектин-1, потенциально может вызвать защитный иммунный ответ, направленный против антигена и патогенного агента, из которого он был получен. Этот ответ будет включать активацию и экспансию Т-клеток, секрецию цитокинов и активацию В-клеток. Таким образом, вакцина, нацеленная на антитело к дектину-1, может быть разработана для доставки антигенов к дендритным клеткам и способствовать распознаванию и уничтожению патогенного агента (например, раковых клеток или патогена). Антиген-мишень можно слить с антителом к дектину-1 для доставки к APC (**Фиг. 29А**), или биспецифическое антитело к дектину-1 можно использовать для направленной доставки патогенного агента к APC (**Фиг. 29В**).

[0235] Чтобы определить, может ли фагоцитоз дендритными клетками человека стимулироваться взаимодействием антитела с дектином-1, очищенные моноциты (CD14+) из PBMC человека дифференцировали в дендритные клетки в присутствии IL4/GMCSF. Через 6 дней дендритные клетки инкубировали с мечеными pHrodo полистироловыми частицами, конъюгированными с антителом к дектину-1 15E2 или изотипическим контролем. Как показано на **Фиг. 30**, антитела к дектину-1 стимулировали направленный фагоцитоз частиц культивируемыми дендритными клетками, происходящими из моноцитов. Наблюдали значительно больший фагоцитоз частиц, конъюгированных с антителом к дектину-1, чем частиц, конъюгированных с изотипом, о чем свидетельствуют ярко-красные частицы с pHrodo внутри клеток. Дендритные клетки являются специализированными антигенпрезентирующими клетками. Нацеливание антигена на патогенном агенте (*например*, раковой клетке, патогене или белковом агрегате), или самого агента на дендритные клетки через дектин-1 потенциально может вызвать защитный иммунный ответ, направленный против антигена и патогенного агента, из которого он был получен. Этот ответ может включать активацию и экспансию Т-клеток, секрецию цитокинов и активацию В-клеток. Таким образом, вакцина, нацеленная на антитело к дектину-1, может быть разработана для доставки антигенов к дендритным клеткам и способствовать распознаванию и уничтожению патогенного агента (*например*, раковой клетки или патогена).

[0236] Также оценивали нацеливание на другой вирус, SARS-CoV-2, с использованием агонистических биспецифических антител к дектину-1. С помощью климации было создано биспецифическое антитело для нацеливания на дектин-1 и шиповидный белок S1 SARS-CoV-2. Шиповидный белок наносили на частицы, а затем частицы поглощали в присутствии биспецифической молекулы к дектину-1/ шипу S1 SARS-CoV-2 (**Фиг. 31А**). Биспецифическая молекула к дектину-1/шипу S1 SARS-CoV-2 индуцировала связывание между клетками НЕК 293, экспрессирующими дектин-1, и

частицами, покрытыми шипами (**Фиг. 31B**), а также стимулировал фагоцитоз частиц, покрытых шипами, клетками, экспрессирующими дектин-1 (**Фиг. 31C**). Основываясь на этих результатах, биспецифическая молекула к дектину-1/ шиповидному белку S1 SARS-CoV-2 может опосредовать направленную доставку шиповидного белка SARS-CoV-2 к макрофагам.

Выводы

[0237] Биспецифическое антитело, содержащее плечо, связывающее дектин-1, и второе плечо, которое связывает антиген из патогена, такого как вирус гриппа или SARS-CoV-2, как описано в этом примере, может способствовать поглощению целевого патогена и презентации антигенов с последующей активацией и экспансией Т-клеток и продукцией антител В-клетками. Адаптивный иммунный ответ может способствовать элиминации вируса и инфицированных вирусом клеток. Вакцина, нацеленная на антитела к дектину-1, может быть использована и против других патогенов бактериального или вирусного происхождения.

[0238] Разработаны различные биспецифические антитела к дектину-1 (например, 2M24)/антигену, и показано, что они эффективно связываются с APC. Оценивали интернализацию целевого антигена из APC. Разработали способы оценки антигенной презентации антигена-мишени на поверхности дендритных клеток. Активацию CD4+ и CD8+ Т-клеток (экспансию Т-клеток и секрецию цитокинов) оценивали по дендритным клеткам, которые получили антиген через дектин-1. Оценивали активацию В-клеток и продукцию антител к антигену. Мышей вакцинировали и у них оценивали адаптивный иммунный ответ *in vivo*, а также защиту от заболевания, вызванного патогеном/злокачественными клетками.

Пример 8: Дизайн биспецифической молекулы для разработки человеческого биспецифического антитела, нацеленного на дектин-1 и мишень заболевания или антиген

[0239] Для обеспечения сборки и эффективного производства высокоочищенных и активных биспецифических молекул, были приняты принципы конструирования, основанные на ранее описанных стратегиях, включая «выступы-во-впадины» (Ridgway, 1996; патент US8679785B2), DuetMab (Mazor, 2015; патент EP3452089A2), одностадийные способы очистки авидности белков А и G (Ollier, 2019; AU2018204314B2) и мутации для устранения связывания FcR (патент WO 2016/081746 A2). Сборка полной биспецифической молекулы включает экспрессию 4 отдельных субъединиц, например, клонированных в векторы экспрессии, такие как pFUSE. Схема иллюстративного биспецифического антитела к дектину-1 показана на **Фиг. 32A**.

[0240] Как показано в таблице 1, биспецифические антитела с использованием этого дизайна были сконструированы для исследований, подтверждающих концепцию. Эти биспецифические антитела имеют одно плечо, нацеленное на дектин-1 человека, и второе плечо, нацеленное на hCD20, hHER2, hCD70 или белок на RSV. Биспецифические антитела, описанные в таблице 1, были получены путем экспрессии всех 4 цепей и

раковых клеток-мишеней моноцитами, макрофагами и дендритными клетками; и (3) фагоцитированные антигены представлены макрофагами и DC, процесс, который запускает Т-клеточный иммунный ответ, направленный на уничтожение раковых клеток.

[0243] Биспецифические антитела 2M24/CD20 и 2M24/RSV, описанные в таблице 1, тестировали на связывание с клетками, экспрессирующими дектин-1 человека или CD20. 2M24/RSV использовали во всех анализах в качестве изотипического контроля в отношении мишень-связывающего плеча. Тестируемые в данном документе биспецифические варианты содержали мутации в домене Fc hIgG1 (инертный hIgG1), которые исключали связывание Fc с Fc-рецепторами (L234A, L235E и G237A, согласно нумерации EU). Связывание биспецифического антитела 2M24/CD20 или 2M24/RSV с клетками HEK293, стабильно экспрессирующими дектин-1 человека, оценивали с помощью проточной цитометрии (**Фиг. 33А**). Биспецифические антитела 2M24/CD20 и 2M24/RSV с инертным hIgG1 были способны связываться с клетками, экспрессирующими дектин-1 человека, с аналогичной аффинностью (значения EC50 связывания на основе клеток 1,4 и 1,7 нМ, соответственно). Таким образом, биспецифические антитела 2M24/CD20 или 2M24/RSV демонстрировали высокую аффинность связывания с клетками HEK293, экспрессирующими дектин-1.

[0244] Связывание ритуксимаба, биспецифических антител 2M24/CD20 или 2M24/RSV с активным или инертным hIgG1 также оценивали с использованием экспрессирующей CD20 линии клеток В-клеточной лимфомы Raji (**Фиг. 33В**). Биспецифические антитела 2M24/CD20 (активные или инертные изотипы hIgG1) были способны связываться с экспрессирующими CD20 клетками Raji, но с по меньшей мере 10-кратным снижением аффинности по сравнению с ритуксимабом. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что разница в аффинности связывания CD20 между биспецифической молекулой 2M24/CD20 и ритуксимабом, вероятно, опосредована потерей avidности (моновалентного связывания по сравнению с двухвалентным связыванием) в биспецифическом антителе.

[0245] Затем анализировали способность биспецифического антитела 2M24/CD20 индуцировать связывание клеток, экспрессирующих дектин-1 человека, и клеток, экспрессирующих hCD20. Клетки HEK293, экспрессирующие дектин-1, (эффектор), и клетки Raji, экспрессирующие CD20, (мишень) дифференциально метили красителями кальцеином зеленым (эффектор) или кальцеином красным (мишень). Меченые клетки совместно культивировали и обрабатывали биспецифическим антителом 2M24/CD20 или 2M24/RSV (контроль) с инертным hIgG1 для индукции связывания эффектор:мишень. Успешное связывание эффектор:клетки-мишени указывалось двойным положительным окрашиванием (кальцин зеленый+, кальцеин красный+, квадратная рамка; **Фиг. 34А**). Эффективность связывания (количественно определяемую как процент от общего числа клеток-мишеней, которые соединяются или связываются с эффекторными клетками) анализировали с использованием титрования дозы биспецифического антитела в совместных культурах эффектор:клетки-мишени (**Фиг. 34В**).

[0246] Эти результаты демонстрируют, что биспецифическое антитело 2M24/CD20 может связывать «эффektorные» клетки, экспрессирующие дектин-1, и «клетки-мишени», экспрессирующие CD20, с мощным EC50 0,17 нМ. Несмотря на низкую аффинность связывания биспецифической молекулы 2M24/CD20 с CD20 на клетках Raji (**Фиг. 33B**), связывание 2M24/CD20 было высокоэффективным. Эти данные свидетельствуют о том, что аффинность связывания 2M24/CD20 повышается за счет высокой экспрессии дектина-1 или CD20 как на эффektorных клетках, так и на клетках-мишенях (авидность), тем самым способствуя эффеkтивному связыванию двух клеток. На основании этих результатов считается, что биспецифическое антитело 2M24/CD20 может эффеkтивно взаимодействовать с моноцитами, макрофагами или дендритными клетками, экспрессирующими дектин-1, с клетками-мишенями, такими как В-клеточная лимфома, которые экспрессируют высокие уровни CD20. Взаимодействие эффеkтор:мишень является первым шагом в механизме действия биспецифических антител 2M24.

[0247] Активный изотип IgG1 человека связывает Fcγ-рецепторы на NK-клетках или моноцитах. Таким образом, оценивали, может ли активный изотип hIgG1 2M24/CD20 запускать уничтожение моноцитов NK-клетками (через антителозависимую клеточную цитотоксичность, АЗКЦ) или другими моноцитами (фратрицид или антителозависимый клеточный фагоцитоз, АЗКФ). В этом варианте активный домен hIgG1 2M24/CD20 взаимодействует с Fcγ-рецепторами на NK-клетках или моноцитах и рецептором дектином-1 на моноцитах, тем самым вызывая Fcγ-опосредованную активацию и истощение мишени. PBMC от двух здоровых доноров - донора 76 (**Фиг. 35A**) и донора 77 (**Фиг. Фиг. 35B**) обрабатывали возрастающими концентрациями биспецифических молекул 2M24/CD20 (активные или инертные изотипы hIgG1) и ритуксимабом в течение 24 ч, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии для количественного определения уровней оставшихся живых CD14+ моноцитов (в % от изотипических контролей). Ни у одного из доноров не было обнаружено снижения числа моноцитов, что указывает на то, что 2M24/CD20 с активным IgG1 не вызывает истощения моноцитов. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) не должен влиять на уровни моноцитов и, таким образом, представляет минимальный риск инфекции.

[0248] На основании предполагаемого механизма действия биспецифического антитела 2M24/CD20 (описанного на **Фиг. 32B**) оценивали истощение В-клеток биспецифическим антителом 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) или ритуксимабом для сравнения истощения В-клеток. PBMC от двух здоровых доноров - донора 83 (**Фиг. 36A**) и 84 (**Фиг. 36B**) - обрабатывали возрастающими концентрациями указанных антител в течение 24 часов, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии для количественного определения уровней оставшихся живых CD19+ В-клеток (указаны как % В-клеток от PBMC, обработанных изотипическим контролем). Таким образом, у двух здоровых доноров высокие концентрации биспецифического антитела 2M24/CD20 индуцировали превосходящее истощение В-клеток (снижение ~80%) по сравнению с

ритуксимабом (снижение ~40%), несмотря на двухвалентную природу связывания ритуксимаба и ~10-кратную разницу в аффинность связывания (как показано на **Фиг. 33В**). Уникальный механизм действия 2М24/CD20 с активным IgG1, который включает связывание с дектином-1 на миелоидных клетках, Fcγ-рецепторами на NK-клетках и моноцитах и CD20 на В-клетках-мишенях (**Фиг. 32В**), приводит к общему превосходящему истощению В-клеток по сравнению с ритуксимабом. Эти данные подтверждают концепцию о том, что индуцированная дектином-1 иммунная стимуляция посредством биспецифической молекулы 2М24/CD20 усиливает истощение клеток-мишеней.

[0249] Оценивали способность биспецифического антитела 2М24/CD20 hIgG1 (активный изотип) или ритуксимаба (hIgG1) подавлять экспрессию CD19 на В-клетках в процессе, известном как «подстригание» или трогоцитоз. Экспрессию CD19⁺ на В-клетках двух здоровых доноров - донора 83 (**Фиг. 37А**) и донора 84 (**Фиг. 37В**) - количественно определяли с помощью проточной цитометрии после 24-часовой инкубации с возрастающей концентрацией биспецифического антитела 2М24/CD20 hIgG1 (активный изотип), ритуксимаба или изотипических контролей. Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) для окрашивания CD19 с использованием антитела к CD19 (конъюгированного с BV605) использовали для оценки влияния биспецифической молекулы 2М24/CD20 и ритуксимаба на экспрессию CD19 на В-клетках. В РВМС от донора 83 EC50 по отношению к экспрессии CD19 составляла 0,014 нМ для ритуксимаба и 0,080 нМ для биспецифической молекулы 2М24/CD20 hIgG1 (**Фиг. 37А**). В РВМС от донора 84 EC50 по отношению к экспрессии CD19 составляла 0,013 нМ для ритуксимаба и 0,090 нМ для биспецифической молекулы 2М24/CD20 hIgG1 (**Фиг. 37В**). Как биспецифические антитела 2М24/CD20 с активным IgG1, так и ритуксимаб приводили к подавлению экспрессии CD19 на В-клетках. Интересно, что ритуксимаб продемонстрировал по меньшей мере в пять раз более сильное «подстригание» по сравнению с биспецифическими антителами 2М24/CD20. Ранее сообщалось о снижении экспрессии CD20-мишени на В-клетках как о механизме, с помощью которого злокачественные В-клетки избегают опосредованного ритуксимабом истощения (Weim, P.V. et al. (2006) *J. Immunol.* 176:2600-2609). Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что биспецифическая молекула 2М24/CD20 с активным IgG1 может быть более эффективной в отношении истощения В-клеток по сравнению с ритуксимабом из-за сниженного потенциала «подстригания».

[0250] Иммунная стимуляция, запускаемая биспецифическим антителом 2М24/CD20 с активным IgG1, приводила к секреции уникального репертуара цитокинов по сравнению с ритуксимабом (**Фиг. 38**). Количественное определение цитокинов на основе ИФА (Mesoscale Discovery) проводили в супернатантах, выделенных из РВМС здоровых доноров, обработанных биспецифическим антителом 2М24/CD20 с активным hIgG1, ритуксимабом или изотипическими контролями. РВМС стимулировали антителами в течение ночи, а затем супернатанты анализировали с помощью MSD. Протестированные

цитокины представляли собой $IFN\gamma$, IL-12p70, IL-6, $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-4, IL-13, IL-10 и IL-8. Результаты продемонстрировали, что 2M24/CD20 с активным IgG1 вызывал более высокий уровень и отчетливую активацию цитокинов в PBMC по сравнению с ритуксимабом. Кроме того, взаимодействие только с рецептором дектином-1 и Fc-рецептором с помощью биспецифической молекулы 2M24/RSV не индуцирует высвобождение цитокинов, исключая возможность системной цитокиновой активации. Эти результаты подчеркивают уникальный механизм действия, который отличает биспецифическое антитело 2M24/CD20 с активным IgG1 от ритуксимаба. Не желая привязываться к какой-либо теории, эти результаты также указывают на то, что 2M24/CD20 может запускать высвобождение ответов типа Th1 и Th2 и способствовать иммунной стимуляции микроокружения опухоли.

[0251] Также было обнаружено, что биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) индуцирует превосходное истощение В-клеток и более слабое «подстригание» CD19 по сравнению с ритуксимабом в совместных культурах макрофагов человека и экспрессирующих GFP В-клеток Raji. Совместные культуры макрофагов человека и клеток Raji-GFP (соотношение 3:1) анализировали с помощью проточной цитометрии в присутствии биспецифической молекулы 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип), контроля 2M24/RSV, фукозилированного ритуксимаба или контроля изотипа hIgG1 (**Фиг. 39А**). Совместные культуры инкубировали при 37°C в течение 24 часов, а затем окрашивали конъюгированным с PE Ат к CD206 для мечения макрофагов и антителом к CD19 BV-605 для мечения клеток Raji. Количество оставшихся живых/Raji-GFP+ клеток оценивали в конце эксперимента. Первичные антитела использовали при серийном титровании дозы. CD19 оценивали на клетках Raji-GFP через 24 часа (**Фиг. 39В**), при этом В-клеточный рецептор продемонстрировал снижение СИФ CD19 в присутствии биспецифической молекулы к дектину-1/hCD20 или ритуксимаба. EC50 по отношению к экспрессии CD19 составляла 0,020 нМ для ритуксимаба и 0,95 нМ для биспецифической молекулы 2M24/CD20 hIgG1. Эти результаты демонстрируют усиленное истощение В-клеток (опосредованное Fc γ -рецептором) биспецифическим антителом 2M24/CD20 по сравнению с ритуксимабом. Ритуксимаб снижал поверхностные уровни В-клеточного рецептора CD19 более сильно, чем биспецифическое антитело к дектину-1/hCD20. Точно так же наблюдали «подстригание» рецептора В-клеток для CD20 с помощью ритуксимаба, а снижение CD20 ограничивает эффективность ритуксимаба в отношении истощения В-клеток. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что эти данные указывают на то, что превосходство биспецифической молекулы 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) в отношении истощения В-клеток обусловлено более слабым «подстриганием» рецепторов В-клеток по сравнению с ритуксимабом. Это подчеркивает дифференциальный механизм истощения клеток с помощью биспецифической молекулы 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип).

[0252] Истощение В-клеток также анализировали с использованием суспензий отдельных клеток из биоптатов ткани рака почки. Суспензии отдельных клеток из двух

биоптатов ткани рака почки анализировали с помощью проточной цитометрии в присутствии биспецифического антитела 2M24/CD20 hIgG1 (активного или инертного), контролей 2M24/RSV hIgG1, фукозилированного ритуксимаба и соответствующих изотипических контролей. Биоптаты ткани рака почки диссоциировали на суспензии отдельных клеток и обрабатывали первичными антителами (2 мкг/мл) в течение 24 часов при 37°C. Популяции иммунных клеток анализировали с помощью проточной цитометрии (**Фиг. 40А и 40В**). Количество оставшихся живых В-клеток оценивали с помощью антитела к CD19 и выражали в процентах от популяции CD45+ иммунных клеток (**Фиг. 40С**). Биспецифическое антитело 2M24/CD20 с активным IgG1 индуцировало более выраженное истощение тканевых В-клеток по сравнению с ритуксимабом в суспензии одиночных клеток из биоптатов рака почки. Биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) уменьшало количество В-клеток в биоптатах двух доноров с раком почки на 44% и 46% (соответственно), тогда как ритуксимаб индуцировал снижение количества В-клеток на 33% и 18%, соответственно (**Фиг. 40С**). Данные подтверждают функциональность биспецифической молекулы 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) в отношении истощения клеток в раковых тканях за счет индуцированной дектином-1 иммунной стимуляции и взаимодействия с Fcγ-рецептором. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что, поскольку дектин-1 преимущественно экспрессируется на ассоциированных с опухолью макрофагах (ТАМ) в вышеописанных биоптатах, биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 (активный изотип) может взаимодействовать с ТАМ для усиления истощения клеток-мишеней.

[0253] Была проанализирована секреция цитокинов культивируемыми макрофагами и суспензией одиночных клеток из биоптатов рака почки, стимулированных иммобилизованным антителом к дектину-1 (клон 2M24) или биспецифическим антителом 2M24/CD20. Антитело к дектину-1 (клон 2M24), изотипический контроль или биспецифическое антитело 2M24/CD20 иммобилизовали в течение ночи в полипропиленовых титрационных микропланшетах с U-образным дном в количестве 10 мкг на лунку с последующим культивированием макрофагов, происходящих из моноцитов человека, (**Фиг. 41А и 41В**) или суспензии одиночных клеток из биоптатов рака почки (**Фиг. 41С**). Клетки культивировали в течение 24 часов и оценивали секрецию TNFα в супернатанте с помощью ИФА. В качестве положительного контроля клетки стимулировали зимозаном. Было обнаружено, что антитело к дектину 1 (клон 2M24) индуцирует кластеризацию дектина 1 и секрецию TNFα макрофагами человека. Эти данные свидетельствуют о том, что исходное антитело к дектину-1 (клон 2M24) может способствовать иммуностимуляции в первичных культурах макрофагов, а также в гомогенате одиночных клеток из биоптатов злокачественных новообразований. Поскольку дектин-1 экспрессируется в миелоидных клетках, ожидается, что ассоциированные с опухолью макрофаги в биоптатах рака будут продуцировать цитокины в ответ на стимуляцию антителами к дектину-1. Это способствует переходу ассоциированных с опухолью макрофагов из противовоспалительного в провоспалительное состояние с

сильным противоопухолевым эффектом. Более того, моновалентного связывания биспецифического антитела 2M24/CD20 с дектином-1 было достаточно, чтобы стимулировать кластеризацию дектина-1 и иммунную стимуляцию на макрофагах.

[0254] Также анализировали иммунную стимуляцию иммобилизованным антителом к дектину-1 в суспензиях одиночных клеток из биоптатов рака почки (Фиг. 42). Суспензии одиночных клеток из биоптатов рака почки обрабатывали иммобилизованным антителом к дектину-1 (клон 2M24) или антителом изотипического контроля hIgG4 в течение 24 часов. Супернатанты анализировали с помощью ИФА на высвобождение различных цитокинов, включая IFN γ , IL-6, TNF α , IL-23, IL-12p70, IL-10 и IL-13. Эти результаты демонстрируют, что активация дектина-1 на миелоидных клетках (в этом примере дектин-1 экспрессируется преимущественно ассоциированными с опухолью макрофагами, TAM) вызывает высвобождение специфического репертуара цитокинов, которые либо находятся непосредственно ниже сигнального пути дектина-1, либо опосредованно через активацию других иммунных клеток. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что взаимодействие дектина-1 с биспецифическим антителом 2M24 способствует иммунной стимуляции, которая может модулировать микроокружение опухоли, чтобы способствовать элиминации раковых клеток, экспрессирующих мишень.

Пример 9: Характеристика биспецифического антитела, нацеленного на дектин-1 и CD20

[0255] В этом примере описывается дополнительная характеристика биспецифического антитела, нацеленного на дектин-1 человека и человеческий CD20. Плечо к дектину-1 включало переменные домены 2M24, а плечо к CD20 включало переменные домены ритуксимаба (см. SEQ ID NO: 24 и 25 для доменов VH и VL, соответственно).

Материалы и способы

Экспрессия CD16 на NK-клетках

[0256] PBMC человека от здорового донора обрабатывали серийными разведениями 2M24/CD20 hIgG1 KIF, ритуксимаба KIF и изотипических контрольных антител к RSV hIgG1 KIF. Через 24 часа после обработки PBMC окрашивали антителами против специфичных для линии дифференцировки маркеров для анализа методом проточной цитометрии. Экспрессию CD16 на CD56+ NK-клетках определяли количественно и сравнивали с уровнями экспрессии в группе, обработанной изотипическим контролем.

Экспрессия CD19 на B-клетках

[0257] PBMC человека от здорового донора обрабатывали 0,1 нМ антител 2M24/CD20 hIgG1 KIF, ритуксимаба KIF и изотипического контроля к RSV hIgG1 KIF. Через 24 часа после обработки PBMC окрашивали антителами против специфичных для линии дифференцировки маркеров для анализа методом проточной цитометрии. Экспрессию CD19 (СИФ) на B-клетках определяли количественно.

Истощение В-клеток в РВМС

[0258] РВМС человека от здорового донора обрабатывали серийными разведениями указанных антител. Через 24 часа после обработки РВМС окрашивали антителами против специфичных для линии дифференцировки маркеров для анализа методом проточной цитометрии. Количество В-клеток определяли по отношению к необработанной контрольной группе (показано пунктирной линией на **Фиг. 45**).

Истощение В-клеток в биоптатах рака почки

[0259] Суспензию одиночных клеток получали из биоптатов рака почки, а клетки обрабатывали антителами 2M24/CD20 hIgG1, 2M24/RSV hIgG1, ритуксимабом hIgG1 и изотипическим контрольным антителом к RSV hIgG1. Через 24 часа после обработки клетки окрашивали антителами против специфичных для линии дифференцировки маркеров для анализа методом проточной цитометрии. Количество В-клеток определяли как процент CD19⁺ клеток в популяции CD45⁺ иммунных клеток.

Результаты

[0260] Сначала исследовали влияние биспецифической молекулы 2M24/CD20 на экспрессию CD16 в НК-клетках человека. CD16 необходим для АЗКЦ-активности НК-клеток, поэтому потеря экспрессии CD16 может снизить цитотоксический потенциал НК-клеток. Ритуксимаб индуцировал сильный и устойчивый шеддинг CD16 с НК-клеток по сравнению с 2M24/CD20 hIgG1 KIF (**Фиг. 43**). Напротив, уровни CD16 на НК-клетках лучше поддерживались после обработки биспецифическим антителом 2M24/CD20 по сравнению с лечением ритуксимабом. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что биспецифическая молекула 2M24/CD20 обладает потенциалом для лучшего сохранения цитотоксического потенциала НК-клеток.

[0261] Затем исследовали влияние биспецифической молекулы 2M24/CD20 на экспрессию CD19 в В-клетках человека. Сохранение экспрессии антигена-мишени имеет решающее значение в обеспечении терапевтической активности моноклональных антител. В-клеточные антигены, такие как CD20, CD19 и BCMA, являются подтвержденными иммуноонкологическими мишенями. Известно, что CD19 подавляется посредством «подстригания»/шеддинга после связывания антителами к CD19. При использовании антител, нацеленных на CD20, наблюдали эффект «свидетеля», когда экспрессия CD19 снижалась при лечении ритуксимабом, но не биспецифической молекулой 2M24/CD20 hIgG1 KIF (**Фиг. 44**). Уровни CD19 на В-клетках лучше поддерживались биспецифическим антителом 2M24/CD20 по сравнению с ритуксимабом. Не желая привязываться к какой-либо теории, можно предположить, что с терапевтической точки зрения биспецифическая молекула 2M24/CD20 может проявлять длительную активность из-за минимального воздействия на экспрессию антигена-мишени.

[0262] Для сравнения ритуксимаба с антителом к CD20 обинутузумабом были созданы биспецифические антитела к CD20 2M24 с использованием последовательностей переменных доменов ритуксимаба или обинутузумаба. Последовательности переменных доменов обинутузумаба были следующими. VH:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD
 TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTL
 VTVSS (SEQ ID NO:46); VL:
 DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID
 NO:47).

[0263] В анализе АЗКЦ/АЗКФ 2М24/CD20 (полученный из последовательности ритуксимаба) продемонстрировал почти полное истощение В-клеток, превосходящее таковое для 2М24/CD20 (полученного из обинутузумаба) или исходных двухвалентных антител и изотипического контроля (Фиг. 45). Эти данные подтверждают целесообразность применения последовательности ритуксимаба для разработки биспецифической молекулы 2М24/CD20

Пример 10: Характеристика биспецифического антитела, нацеленного на дектин-1 и CD20, в предварительном исследовании на отличных от человека приматах

[0264] В этом примере описаны результаты поискового исследования безопасности и эффективности биспецифического антитела, нацеленного на дектин-1 человека и человеческий CD20, описанного в Примере 9, на яванских макаках.

Материалы и способы

[0265] Три группы яванских макак (1 самец и 1 самка на группу) получали однократную дозу (5 мг/кг) исследуемых препаратов: А) 2М24/CD20 hIgG1 KIF, В) 2М24/CD20 с инертным hIgG1 и С) ритуксимаб hIgG1 KIF. Кровь собирали в указанные моменты времени. Сокращения для исследуемых препаратов (2М24/CD20 KIF, 2М24/CD20 инертный, RTX KIF).

[0266] Уровни В-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Истощение количественно определяли по количеству CD19+ В-клеток, оставшихся в образцах после введения дозы, по сравнению с уровнями до введения исследуемых препаратов. Аспираты костного мозга и лимфатических узлов собирали в указанные моменты времени, и уровни В-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. Истощение количественно определяли по количеству CD19+ В-клеток, оставшихся в образцах после введения дозы (день 7), по сравнению с уровнями до введения исследуемых препаратов (день -7).

[0267] Для анализа РВМС, РВМС от здорового яванского макака обрабатывали серийными разведениями 2М24/CD20 hIgG1 KIF, ритуксимаба KIF и изотипического контрольного антитела к RSV hIgG1 KIF. Через 24 часа после обработки РВМС окрашивали антителами против специфичных для линии дифференцировки маркеров для анализа методом проточной цитометрии. Истощение В-клеток определяли количественно относительно группы изотипического контроля.

Результаты

[0268] Это поисковое исследование было разработано для изучения безопасности и эффективности биспецифического антитела 2М24/CD20 у отличных от человека

приматов. Дизайн исследования показан на **Фиг. 46**. Яванские макаки разделяли на три группы лечения, включающие по 2 животных (1 самец, 1 самка) в каждой группе. Каждой группе вводили конкретный исследуемый препарат в однократной дозе 5 мг/кг. Исследуемые препараты включали: 1) 2M24/CD20 hIgG1 K1F, 2) 2M24/CD20 hIgG1 инертный и 3) ритуксимаб hIgG1 K1F. Животные находились под ежедневным наблюдением, а образцы цельной крови, костного мозга, лимфатических узлов и тканей толстой кишки собирали по мере необходимости. Исследование было запланировано на 8 недель.

[0269] Как показано на **Фиг. 47** (вверху), биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 K1F истощало В-клетки *in vivo* у яванских макаков. Почти полное и устойчивое истощение В-клеток (~98%) наблюдали у обоих животных, получавших однократную дозу (5 мг/кг) 2M24/CD20 hIgG1 K1F. В группе ритуксимаба (**Фиг. 48**) у одного животного наблюдали полное истощение, тогда как у второго наблюдали устойчивое, но неполное истощение (~87%). Частичное истощение В-клеток наблюдали у одного животного в группе 2M24/CD20 с инертным hIgG1 (**Фиг. 47** ниже), тогда как у второго животного не наблюдали истощения на 7-й день. Биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 K1F хорошо переносилось яванскими макаками.

[0270] Биспецифическая молекула 2M24/CD20 hIgG1 K1F также истощала В-клетки костного мозга (**Фиг. 49А**) и лимфатических узлов (**Фиг. 49В**) *in vivo* у яванских макаков. Однократная доза (5 мг/кг) 2M24/CD20 hIgG1 K1F вызывала сильное истощение В-клеток в костном мозге (~87-88%) и частичное истощение в лимфатических узлах (60-78%) у обоих животных. В группе ритуксимаба также наблюдали истощение В-клеток в обеих тканях. Частичное истощение В-клеток наблюдали в группе 2M24/CD20 с инертным hIgG1, за исключением животного СВ764А с минимальным истощением В-клеток в лимфатическом узле.

[0271] Биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 K1F также индуцировало сильное истощение В-клеток яванского макака *ex vivo* (**Фиг. 50**). 2M24/CD20 hIgG1 K1F индуцировало сильное истощение В-клеток по сравнению с ритуксимабом hIgG1 K1F. Максимальное истощение, достигнутое ритуксимабом, составило ~30% В-клеток, тогда как биспецифическое антитело 2M24/CD20 hIgG1 K1F продемонстрировало максимальное истощение при ~50%.

Пример 11: Очистка и функциональная характеристика биспецифического антитела 2M24/CD20 в формате scFv

[0272] В этом примере описывается получение, очистка и характеристика биспецифического антитела 2M24/CD20, в котором плечо, нацеленное на дектин-1, (на основе переменных доменов 2M24) представляло собой scFv, слитый с доменом Fc IgG1 человека с мутациями, образующими выступы, и плечо, нацеленное на CD20, было основано на ритуксимабе hIgG1 с мутациями, образующими впадины. Схема молекулы показана на **Фиг. 51**. Мутация, образующая выступ, на плече, нацеленном на дектин-1, представляла собой Т366W; мутации, образующие выступы, в плече, нацеленном на

CD20, представляли собой T366S, L368A и Y407V. Не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что этот формат обеспечивает универсальную платформу для создания биспецифических антител к дектину-1 с более простыми требованиями к производству (например, по сравнению с биспецифическими антителами, имеющими плечо к дектину-1 с несколькими полипептидными цепями).

[0273] scFv 2M24/CD20 hIgG1 экспрессировали в клетках Нек293 путем трансфекции 3 плазмид (плазида scFv 2M24 hIgG1, тяжелая цепь к CD20 и легкая цепь к CD20). Супернатант собирали после четырех дней экспрессии и очищали с помощью белка А. Агрегаты удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии. Как показано на **Фиг. 52А**, биспецифическое антитело scFv 2M24/CD20 hIgG1, очищенное в виде гомогенной молекулы с помощью ЭХ.

[0274] Затем совместные культуры CD20-экспрессирующих клеток Raji и экспрессирующих дектин-1 репортерных клеток НЕК обрабатывали увеличивающейся концентрацией биспецифической молекулы scFv 2M24/CD20 hIgG1. Активацию репортера оценивали путем измерения уровней SEAP (на основе поглощения при 630 нм) в среде. Биспецифическая молекула способствовала целенаправленной иммунной стимуляции, что было оценено с помощью этого репортерного анализа NFκB (**Фиг. 52В**).

[0275] Для изучения истощения В-клеток РВМС человека от здорового донора обрабатывали серийными разведениями указанных антител. Через 24 часа после обработки РВМС окрашивали антителами против специфичных для линии дифференцировки маркеров для анализа методом проточной цитометрии. В-клетки количественно определяли относительно необработанной контрольной группы (обозначенной пунктирной линией на **Фиг. 52С**). Результаты показали, что биспецифическое антитело scFv 2M24/CD20 hIgG1, подобное молекуле 2M24/CD20 hIgG1 KIF, способно уничтожать В-клетки человека (**Фиг. 52С**).

Пример 12: Разработка и характеристика биспецифического антитела к дектину-1/Тгор-2

[0276] Тгор-2 представляет собой мембранный белок типа I из 323 АК, участвующий в сигнальной кальциевой трансдукции, развитии эмбриона и плода, образовании плотных контактов и интегрин-зависимом сигналинге. Мутации в Тгор-2 связаны с студенистой каплевидной дистрофией роговицы, характеризующейся амилоидозом роговицы и слепотой. Тгор-2 сверхэкспрессируется при различных злокачественных эпителиальных новообразованиях, способствуя клеточной пролиферации, инвазии и неоваскуляризации. Высокая экспрессия коррелирует с плохим прогнозом и выживаемостью при многих злокачественных новообразованиях (особенно при ТНРМЖ и раке легкого НМРЛ). Сацитузумаб говитекан (Trodelvy®), ADC, направленный на Тгор-2, является единственным терапевтическим средством, одобренным для лечения пациентов с метастатическим ТНРМЖ. Ускоренная регистрация FDA в 2020 году.

[0277] Таким образом, Тгор-2 является онкологической мишенью, которая

клинически подтверждена. Тем не менее, существует неудовлетворенная потребность: Trodelvy® достиг 33% ответа в группе пациентов с метастатическим ТНРМЖ, предварительно получавших интенсивное лечение. Побочные реакции, такие как нейтропения, диарея и рвота, связаны с конъюгатом токсина Trodelvy (SN-38).

[0278] Напротив, подход, направленный на антитело на дектин-1, имеет потенциал для ограничения противоопухолевой активности в микроокружении болезни. Иммунная модуляция и фагоцитарная активность 2M24 жестко регулируются присутствием раковых клеток. В то время как Trodelvy® имеет единственный механизм действия (доставка конъюгата токсина для индуцирования уничтожения клеток-мишеней), в подходе, направленном на антитело к дектину-1, используется несколько механизмов действия (направленная иммунная стимуляция, фагоцитоз и презентация антигена) для уничтожения раковых клеток и способствуют длительному иммунитету.

[0279] В этом примере описана разработка и характеристика биспецифического антитела к дектину-1 (2M24)/Тгор-2. Вариабельные домены, используемые для анти-Тгор-2, были следующими. VH: QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTG EPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGGFGSSYWYFDVWGQG SLVTVSS (SEQ ID NO:42); VL: DIQLTQSPSSLSASVGD RVSITCKASQDVSI AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIK (SEQ ID NO:43).

[0280] Биспецифическое антитело 2M24/Тгор-2 очищали с помощью эксклюзионной хроматографии, и очищенное антитело анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невозстанавливающих (NR) или восстанавливающих (R) условиях (Фиг. 53А). Биспецифическое антитело 2M24/Тгор2, очищенное в виде монодисперсной молекулы. Было обнаружено, что биспецифическое антитело 2M24/Тгор2 связывается с высокой аффинностью с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1 (Фиг. 53В), и умеренной аффинностью с линией раковых клеток А431, экспрессирующей Тгор-2 (Фиг. 53С).

[0281] Для оценки уровня экспрессии Тгор-2 на различных раковых клетках, линии раковых клеток (А431 и SKBR3) окрашивали конъюгированными с PE антителами к Тгор-2 человека или контрольными изотипическими антителами для оценки экспрессии Тгор-2. Количество копий рецептора оценивали путем сравнения интенсивности флуоресценции меченых флуорохромом микросфер с известным количеством флуорофора с интенсивностью флуоресценции меченых клеток с помощью проточной цитометрии. Было обнаружено, что Тгор-2 на высоком уровне экспрессируется в линиях раковых клеток А431 и SKBR3 с числом копий рецептора 8,4 миллиона и 1,1 миллиона, соответственно (Фиг. 54). Эти результаты демонстрируют, что полипептид Тгор-2 на высоком уровне экспрессируется на раковых клетках. Высокая экспрессия на раковых клетках делает Тгор-2 привлекательным антигеном для направленного уничтожения раковых клеток биспецифическим антителом 2M24/Тгор-2.

[0282] Затем исследовали связывание биспецифического антитела 2M24/Trop-2 с линиями клеток, экспрессирующими Trop-2. Линии раковых клеток (HeLa, SiHa, ВхРС-3 и Саран-2) инкубировали с серийными разведениями биспецифического антитела 2M24/Trop-2 hIgG1 или изотипического контрольного антитела в одной концентрации (300 нМ). Вторичное антитело (конъюгированное с AF647 козье античеловеческое антитело) использовали для обнаружения с помощью проточной цитометрии. ЕС50 связывания определяли с использованием четырехпараметрической логистической (4PL) нелинейной регрессии. Результаты показали, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 связывается с различной субмикромольной аффинностью с различными линиями клеток, экспрессирующими Trop-2 (**Фиг. 55А-55D**).

[0283] Биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 анализировали на способность истощать линии клеток, экспрессирующие Trop-2. Макрофаги получали из моноцитов, культивируемых с MCSF в течение 6 дней. После дифференцировки макрофаги совместно культивировали с линиями раковых клеток, экспрессирующими Trop-2, SKBR3 или A431, в течение 24 часов в присутствии 10 мкг/мл 2M24/Trop-2 hIgG1 или 2M24/RSV hIgG1. Для обнаружения макрофагов использовали PE-антитело к CD206. Раковые клетки выявляли либо путем предварительного окрашивания кальцеином AM (**Фиг. 56А**, клетки SKBR3), либо с использованием APC-антитела к EPCAM (**Фиг. 56В**, клетки A431). Фагоцитоз оценивали с помощью проточной цитометрии по двойным положительным клеткам PE-CD206+кальцеин+ в гейте одиночной клетки для клеток SKBR3 (**Фиг. 56А**) или по оставшимся EPCAM+ клеткам для клеток A431 (**Фиг. 56В**). Результаты показали, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 индуцирует сильное истощение обеих линий раковых клеток, которые экспрессируют Trop-2. Биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 индуцировало фагоцитоз линий клеток, экспрессирующих Trop-2, макрофагами. Уменьшение количества раковых клеток составило 56% для SKBR3 (**Фиг. 56А**) и 87% для раковых клеток A431 (**Фиг. 56В**). Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 может направлять макрофаги на уничтожение раковых клеток, экспрессирующих Trop-2.

[0284] Экспрессию Trop-2 в неиммунных клетках и экспрессию дектина-1 в ассоциированных с опухолью макрофагах оценивали в суспензии одиночных клеток из ткани биоптата рака легкого. Trop-2 оценивали в CD45- раковых клетках с использованием конъюгированного с PE антитела к Trop-2. Экспрессию EPCAM также подтверждали в той же популяции. Экспрессию дектина-1 подтверждали в ассоциированных с опухолью макрофагах, гейтированных как CD45+CD11b+CD163+ клетки, после исключения В-клеток, Т-клеток и NK-клеток (**Фиг. 57А и 57В**). Дектин-1 экспрессируется в ассоциированных с опухолью макрофагах, а Trop-2 экспрессируется в раковых клетках из биоптата рака легкого.

[0285] Чтобы исследовать, способно ли биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 вызывать истощение Trop-2-экспрессирующих раковых клеток из ткани биоптата рака легкого, из биоптата рака легкого получали суспензию одиночных клеток, и клетки

обрабатывали антителами 2M24/Trop-2 hIgG1 или 2M24/RSV hIgG1. Через 24 часа обработки раковые клетки количественно определяли путем окрашивания FITC-антителом к CD45 и APC-антителом к EPCAM для последующего анализа методом проточной цитометрии. Уменьшение числа раковых клеток выражали как процент CD45-EPCAM+ клеток в популяции живых клеток. Результаты показали, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 истощает раковые клетки, экспрессирующие Trop-2, в биоптате рака легкого (**Фиг. 58**). Биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 индуцировало 50% снижение количества раковых клеток, экспрессирующих Trop-2, в биоптате рака легкого. Данные демонстрируют, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 может индуцировать фагоцитоз и элиминацию раковых клеток ассоциированными с опухолью макрофагами в ткани рака легкого.

[0286] Для оценки сигналинга дектина-1, стимулируемой биспецифическим антителом 2M24/Trop-2, клетки НЕК с репортером NFκB, экспрессирующие дектин-1, инкубировали с раковыми клетками A431 в присутствии серийного титрования биспецифического антитела 2M24/Trop-2 или 2M24/RSV. Биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 взаимодействует с двумя линиями клеток, способствуя кластеризации рецепторов дектина-1 и последующей активации NFκB. После активации SEAP высвобождается в среду и используется в качестве сигнала для активации дектина-1. Уровни SEAP в среде определяли количественно с использованием спектрофотометра. Биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 индуцировало сильную стимуляцию дектина-1 и активности нижерасположенного NFκB (**Фиг. 59**). Эти данные демонстрируют, что биспецифическая молекула 2M24/Trop-2 способствует сигналингу дектина-1 в эффекторных клетках в присутствии клеток, экспрессирующих Trop-2. Таким образом, биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 может стимулировать опосредованную дектином-1 иммунную стимуляцию моноцитами и макрофагами, которые экспрессируют высокие уровни дектина-1.

[0287] Затем исследовали влияние биспецифического антитела 2M24/Trop-2 на презентацию антигена и активацию Т-клеток. В этом анализе, как показано на **Фиг. 59B**, макрофаги, полученные из моноцитов, совместно культивировали с клетками рака молочной железы SKBR3 в присутствии биспецифического антитела 2M24/Trop-2. Макрофаги являются NY ESO-отрицательными, тогда как клетки SKBR3 являются NY ESO-положительными. Биспецифическое антитело стимулировало фагоцитоз и деградацию клеток SKBR3, а также последующую загрузку пептида ESO на MHC класса I или II на поверхности макрофагов. Затем к анализу совместного культивирования добавляли антигенспецифические (ESO-реактивные) Т-клетки, где TCR распознает комплекс ESO/MHC. Это взаимодействие инициирует активацию Т-клеток, что приводит к высвобождению цитокинов (например, IFNγ) и экспрессии маркеров ранней активации, таких как CD69. Этот анализ позволяет проводить прямую оценку зависимого от биспецифического антитела 2M24/Trop-2 фагоцитоза и презентации антигенов клетками-мишеней. Результаты показаны на **Фиг. 59C-59E**. Макрофаги и клетки рака молочной

железы SKBR3 совместно инкубировали в присутствии биспецифического антитела 2M24/Trop-2 hIgG1 или контрольного биспецифического антитела 2M24/RSV hIgG1. Фагоцитоз или истощение клеток SKBR3 оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания экспрессии EPCAM на клетках SKBR3 (Фиг. 59С). Активация Т-клеток измеряется высвобождением гамма-интерферона и экспрессией CD69. Уровни IFN- γ в супернатантах определяли количественно (Фиг. 59D), а экспрессию CD69, маркера ранней активации, на Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии (Фиг. 59E). Эти данные показали, что биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 способствует презентации антигена и активации Т-клеток. Биспецифическое антитело 2M24/Trop-2 hIgG1 индуцировало активацию Т-клеток, стимулируя фагоцитоз клетки-мишени или антигена макрофагами и последующую презентацию неоантигена (ESO-пептида) на МНС класса I на поверхности макрофагов. Эти данные демонстрируют, что биспецифических антител, нацеленных на дектин-1 на антигенпрезентирующих клетках (APC), достаточно для активации Т-клеток.

Пример 13: Разработка и характеристика биспецифического антитела к дектину-1/нектину-4

[0288] Нектин-4, или PVRL4, принадлежит к подсемейству нектинов иммуноглобулин-подобных молекул адгезии, которые участвуют в Ca(2+)-независимой межклеточной адгезии. Он состоит из трех консервативных иммуноглобулин-подобных доменов (V, C, C) во внеклеточной области. Нектин-4 в основном экспрессируется во время развития плода (эмбрион и плацента) и экспрессия снижается с возрастом.

[0289] Сообщалось о сверхэкспрессии нектина-4 при многих типах злокачественного новообразования. Его резэкспрессия во время развития опухоли делает его ассоциированным с опухолью антигеном с возможностью разработки таргетной терапии. Сайленсинг нектина-4 ингибирует рост опухоли, пролиферацию и миграцию клеток (Deng et al (2019) Cancer Cell Int. 19:106; Nishiwada et al (2015) J. Exp. Clin. Cancer Res. 34:30). Нектин-4 взаимодействует с ErbB2 и его устойчивыми к трастузумабу вариантами сплайсинга, усиливая их активацию и синтез ДНК. (Kedashiro et al (2019) Sci. Rep. 9:18997). Нектин-4 расщепляется ADAM-17, и циркулирующий нектин-4 обнаруживается при раке молочной железы (Fabre-Lafay et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:19543-19550; Fabre-Lafay et al. (2007) BMC Cancer 7:73).

[0290] Энфортумаб ведотин (ASG-22ME) представляет собой первый в своем классе конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), направленный против нектина-4. Моноклональное антитело энфортумаб ведотин связывается с клетками, экспрессирующими нектин-4, с последующей интернализацией и высвобождением противоопухолевого агента монометилауристатина E (MMAE) в клетку, что приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу. Энфортумаб ведотин (Padcev) был одобрен для лечения уротелиального рака у пациентов, которые ранее получали ингибиторы PD-1 или PD-L1 и химиотерапию, включающую препараты на основе платины, на основании исследования NCT03219333 в декабре 2019 года.

[0291] Таким образом, нектин-4 является клинически подтвержденной мишенью для одобренного ADC. Нектин-4 минимально экспрессируется в нормальных тканях, но экспрессируется на высоком уровне при раке мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, поджелудочной железы, легкого и пищевода и др. Нектин-4-положительные типы солидных опухолей имеют повышенный уровень ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM). Экспрессия дектина-1 на TAM была подтверждена секвенированием РНК одиночных клеток и проточной цитометрией. Таким образом, и не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что нацеливание на нектин-4 биспецифического антитела к дектину-1 имеет потенциал для лечения нектин-4-положительных злокачественных новообразований с помощью механизмов, включающих: (1) двойное взаимодействие с нектином-4 на опухолевых клетках и дектином-1 на TAM; (2) индукцию фагоцитоза и истощение опухолевых клеток, экспрессирующих нектин-4, макрофагами; (3) перепрограммирование иммуносупрессивного окружения путем индуцирования высвобождения цитокинов посредством кластеризации дектина-1 на TAM; и/или (4) презентацию опухолевых неоантигенов, активацию адаптивных иммунных клеток, таких как Т- и В-клетки, и обеспечение стойкого противоопухолевого иммунитета за счет вовлечения профессиональных антигенпрезентирующих клеток в микроокружение опухоли.

[0292] Биспецифическое антитело 2M24/нектин-4 показано на **Фиг. 60А**, в котором используются переменные домены антитела к дектину-1 2M24 и переменные домены антитела к нектину-4 Ha22 (VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIY YADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:40); VL: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPS RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)). Мутации DuetMab в тяжелой цепи включали F126C и C220V; мутации в легкой цепи включали S121C и C214V. Его получали путем трансфекции 4 плазмид (тяжелая цепь 2M24, легкая цепь 2M24, тяжелая цепь к нектину-4 и легкая цепь к нектину-4) в клетки HEK293. Супернатант собирали после четырех дней экспрессии и очищали с помощью белка А (**Фиг. 60В**).

[0293] Экспрессию нектин-4 оценивали в линиях раковых клеток SKBR3 и A431 (**Фиг. 61А**), а также в суспензии одиночных клеток биоптатов рака предстательной железы или яичника (**Фиг. 61В**). Нектин-4 выявляли с использованием антител к нектину-4 mIgG2b и конъюгированного с Alexa Fluor-647 вторичного антитела. Антитело изотипа mIgG2b использовали в качестве отрицательного контроля для фонового окрашивания. Экспрессию нектин-4 наблюдали в линиях раковых клеток, а также в раковых клетках в тканях биоптата опухоли.

[0294] Анализировали связывание биспецифического антитела 2M24/нектин-4 с клетками, экспрессирующими дектин-1 или нектин-4. Линии клеток, экспрессирующие

дектин-1 (клетки НЕК) или нектин-4 (клетки A431), инкубировали с серийными разведениями биспецифического антитела 2M24/нектин-4 hIgG1 или антитела к RSV hIgG1 (изотипический контроль) для оценки связывания с мишенью. Вторичное антитело (конъюгированное с AF647 козьё антитело к IgG человека) использовали для обнаружения с помощью проточной цитометрии. Значения EC50 связывания определяли с использованием четырехпараметрической логистической (4PL) нелинейной регрессии. Результаты показали, что биспецифическое антитело 2M24/нектин-4 связывалось с высокой аффинностью с дектином-1 и с низкой аффинностью с нектином-4 (**Фиг. 62**).

[0295] Активность биспецифического антитела 2M24/нектин-4 измеряли с использованием репортерного анализа NFκB. Изображение схемы анализа показано на **Фиг. 63** (верхний). Клетки НЕК с репортером NFκB, экспрессирующие дектин-1, инкубировали с раковыми клетками A431 в присутствии серийного титрования биспецифического антитела 2M24/нектин-4 или бивалентного антитела к нектину-4. Биспецифическое антитело 2M24/нектин-4 взаимодействует с двумя линиями клеток, способствуя кластеризации рецепторов дектина-1 и последующей активации NFκB. После активации SEAP высвобождался в среду и использовался в качестве сигнала для активации дектина-1. Уровни среды SEAP определяли количественно с использованием спектрофотометра (**Фиг. 63**, ниже). Результаты продемонстрировали сильную стимуляцию дектина-1 и активности нижерасположенного NFκB биспецифическим антителом 2M24/нектин-4.

[0296] Биспецифическое антитело 2M24/нектин-4 анализировали на истощение раковых клеток, экспрессирующих нектин-4. Макрофаги получали из моноцитов, культивируемых с MCSF в течение 6 дней. После дифференцировки макрофаги совместно культивировали с экспрессирующей нектин-4 линией раковых клеток A431 в течение 24 часов в присутствии биспецифического антитела 2M24/нектин-4, бивалентного исходного антитела к нектину-4 или антитела к RSV hIgG1 (изотипический контроль). Для обнаружения макрофагов (**Фиг. 64A**), использовали конъюгированное с PE антитело CD206. Раковые клетки были обнаружены с помощью конъюгированного с APC антитела к EPCAM. Фагоцитоз или истощение оценивали путем количественного определения оставшихся EPCAM-положительных клеток. Данные представлены относительно контроля к RSV (**Фиг. 64B**). Биспецифическое антитело 2M24/нектин-4 было способно истощать экспрессирующие нектин-4 линии раковых клеток посредством целенаправленного фагоцитоза макрофагами. Таким образом, эта биспецифическая молекула обладает потенциалом для направленного истощения нектин-4-положительных злокачественных новообразований.

Пример 14: Разработка и характеристика биспецифического антитела к дектину-1, нацеленного на амилоиды легкой цепи

[0297] Амилоидоз легких цепей (AL) вызывается экспансией медленно растущего клона В-клеток, который продуцирует легкую λ-цепь иммуноглобулина в 75-80% случаев и легкие цепи κ в остальных случаях (Dispenzieri, A. and G. Merlini (2016). Cancer Treat

Res 169: 273-318). Высокие концентрации неправильно уложенных белков легких цепей секретируются в кровотоки и откладываются в различных органах. Отложение амилоида приводит к необратимой недостаточности органов и смерти, если его не лечить. Ежегодно в США диагностируется более 4000 новых случаев AL. У 10-15% пациентов с множественной миеломой развивается AL.

[0298] Существует неудовлетворенная потребность в средствах лечения AL. Миелоидные клетки, такие как тканевые макрофаги, участвуют в тканевом клиренсе амилоидов (Wall et al. (2012) PLoS ONE 7:e52686). У пациентов с наследственным транстретиновым амилоидозом (ATTR) нарушена фагоцитарная активность миелоидных клеток (Suenaga et al. (2016) PLoS ONE 11:e0163944). Направленный фагоцитоз амилоидов легкой цепи через рецептор дектин-1 на миелоидных клетках, таких как макрофаги, моноциты и дендритные клетки, является привлекательным подходом для клиренса амилоидов из тканей. Стратегия направленного привлечения миелоидных клеток с помощью биспецифических антител может обеспечить зависимый от дектина-1 и независимый от Fc фагоцитоз. Не желая привязываться к какой-либо теории, предполагается, что этот подход потенциально может преодолеть ограничения современных стратегий моноклональных антител, которые основаны в первую очередь на Fc-опосредованном сигналинге для клиренса амилоидов.

[0299] Биспецифическое антитело, нацеленное на дектин-1 и амилоиды легкой цепи, было сконструировано с использованием переменных доменов 2M24 к дектину-1 и переменных доменов 11-1F4 к амилоиду. Переменные домены 11-1F4 были следующими.

VH:
 QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLSSYGVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNY
 KPNLMSRLSISKDISKSQVLFKLNLSLQTDATYYCVTLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID
 NO:44); VL:
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLNHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCFQTTYPNTFGGGTKLEIK (SEQ ID
 NO:45).

[0300] Биспецифическую молекулу очищали и анализировали связывающую активность. Исходное двухвалентное антитело 11-1F4 hIgG1 (**Фиг. 65А**, сверху) и биспецифическое антитело 2M24/11-1F4 hIgG1 (**Фиг. 65А**, внизу) очищали в PBS методом эксклюзионной хроматографии. Затем очищенные антитела оценивали на связывание с рекомбинантными амилоидами легкой цепи от разных пациентов (AL30, AL47, AL48 и AL55) с помощью Octet (**Фиг. 65В** для 11-1F4 hIgG1 и **Фиг. 65С** для 2M24/11-1F4 hIgG1). Эти результаты демонстрируют, что биспецифическое антитело 2M24/11-1F4 связывается с амилоидами легкой цепи *in vitro*.

[0301] Также исследовали способность биспецифического антитела 2M24/11-1F4 индуцировать фагоцитоз амилоидов легкой цепи. Моноциты были свежесывороточными из РВМС здоровых доноров и совместно культивировались с амилоидами легких цепей, мечеными pHrodo, в присутствии либо инертного биспецифического антитела 2M24/11-

1F4 hIgG1, либо исходного бивалентного антитела 11-1F4 hIgG1. Фагоцитоз амилоидов легких цепей отслеживали по изменению рН флуоресценции рHrodo в среде фагосом с низким рН. Изменение активности рHrodo в течение 24 часов отслеживали в режиме реального времени с помощью Incucyte. Результаты показали, что биспецифическое антитело 2M24/11-1F4 индуцировало сильный фагоцитоз амилоидных фибрилл легкой цепи по сравнению с контрольным антителом 11-1F4 hIgG1 (**Фиг. 66**). В этом исследовании 2M24/11-1F4, которое имеет неактивный Fc или лишено эффекторной функции, продемонстрировало устойчивую активность по клиренсу амилоидов, что указывает на то, что связывания с дектином-1 было достаточно для стимулирования фагоцитоза. Антитело 11-1F4 hIgG1 содержит активный домен Fc, однако наблюдается минимальная клиренсная активность. Эти данные свидетельствуют о том, что нацеливание на фагоцитарный рецептор дектин-1 является привлекательным подходом к лечению амилоидоза легких цепей.

Пример 15: Разработка и характеристика биспецифического антитела к дектину-1, нацеленного на бета-амилоид при болезни Альцгеймера (БА)

[0302] БА является наиболее распространенной причиной деменции во всем мире. На его долю приходится около 80% всех диагностированных случаев (Weller and Budson, (2018) F1000Res 7). В Соединенных Штатах Америки болезнь Альцгеймера уносит больше жизней, чем рак предстательной железы и молочной железы вместе взятые (Patterson, C. (2018). World Alzheimer Report 2018. The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers. London, UK: Alzheimer's Disease International. Доступен по веб-адресу: www.alz.co.uk/research/world-report-2018). БА подразделяют на две формы: спорадическую и семейную. Девяносто девять процентов случаев БА являются спорадическими, то есть точная причина возникновения неизвестна (Wang, J., Gu, B.J., Masters, C.L., and Wang, Y.-J. (2017). Nat. Rev. Neurol. 13, 612-623). Спорадическая БА (сБА) или БА с поздним дебютом (БА с поздним дебютом), скорее всего, обусловлена генетическими факторами и факторами окружающей среды (Bondi, M. W., Edmonds, E. C., and Salmon, D. P. (2017). J. Int. Neuropsychol. Soc. 23, 818-831). Основным генетическим фактором САР является ген аполипопротеина Е (APOE). Другие мишени, выявленные в исследованиях GWAS, включают экспрессируемый на миелоидных клетках триггерный рецептор-2 (TREM2), рецептор 1 комплемента C3b/C4b (CR1), CR1 (рецептор 1 комплемента C3b/C4b), CD33 и ABCA7 (Hansen, D.V., et al. (2018). J Cell Biol 217(2): 459-472). Многие из этих генов экспрессируются на микроглиальных клетках, что позволяет предположить критическую роль этих клеток в этиологии БА (Hansen, D.V., et al. (2018). J Cell Biol 217(2): 459-472). TREM2 является рецептором поверхности микроглиальных клеток, играющим центральную роль в фагоцитозе, хемотаксисе, выживании и пролиферации микроглии (Carmona, S., Zahs, K., Wu, E., Dakin, K., Bras, J., and Guerreiro, R. (2018). Lancet Neurol. 17, 721-730). Мутация R47H с потерей функции TREM2 приводит к двукратному или четырехкратному увеличению риска БА, подобно риску, связанному с наследованием одной копии варианта e4 APOE (Gratuze, M., Leyns, C. E. G., and Holtzman,

D. M. (2018). *Mol. Neurodegener.* 13:66).

[0303] Большинство генов, связанных с риском развития болезни Альцгеймера, в высокой степени экспрессируются микроглией, что позволяет предположить, что дисфункция микроглии связана с развитием и прогрессированием болезни Альцгеймера (Hansen, 2018). Например, варианты с потерей функции микроглиального фагоцитарного рецептора TREM2 ухудшают клиренс β -амилоидных отложений и связаны с повышенным риском развития деменции. Фагоцитарный рецептор дектин-1 экспрессируется на микроглиальных клетках и, как известно, не является геном, связанным с риском развития БА. Поэтому, не желая привязываться к какой-либо теории, считается, что нацеливание на дектин-1 на микроглиальных клетках может вызвать направленный фагоцитоз и клиренс бета-амилоидов у пациентов с БА. Нацеливание на дектин-1 может позволить обойти варианты генов микроглии с потерей функции, таких как TREM2. В отличие от современных подходов с использованием моноклональных антител, таких как адуканумаб, которые полагаются на Fc-рецепторы на микроглиальных клетках для осуществления фагоцитоза (Sevigny, J., et al. (2016). *Nature* 537(7618): 50-56), этот подход нацелен на консервативный микробный путь, чтобы индуцировать фагоцитоз и иммунную стимуляцию.

[0304] Были созданы биспецифические антитела с одним плечом, нацеленным на дектин-1, и другим плечом, нацеленным на бета-амилоид (на основе последовательностей переменных доменов адуканумаба или леканемаба). Последовательности переменных доменов адуканумаба представлены ниже. VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFAFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDTGK KYYTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARDRGIGARRGPYYMDVW GKGTTVTVSS (SEQ ID NO:48); VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:49). Последовательности переменных доменов леканемаба представлены ниже. VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIY YGDTVKGRFTISRDNKNSLFLQMSSLRAEDTAVYYCAREGGYYYGRSYYTMDYWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:50); VL: DVVMTQSPSLPVTTPGAPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGIYYCFQGSHVPPPTFGPGTKLEIK (SEQ ID NO:51).

[0305] Хотя настоящее изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, описания и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Содержание всей патентной и научной литературы, цитируемой в данном документе, явным образом и в полном объеме включено посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, причем антитело или его фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, причем антитело или его фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPKGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

3. Антитело по п. 2, отличающееся тем, что домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

4. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPKGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

5. Антитело по п. 4, отличающееся тем, что домен VH включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTV

SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLA WYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQAYSF PFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

6. Антитело по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент представляют собой человеческое, гуманизованное или химерное антитело или его фрагмент.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, при этом антитело или его фрагмент связываются с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с EC50 менее 2 нМ.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, при этом антитело или его фрагмент способны связывать дектин-1 человека или яванского макака.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, причем антитело или его фрагмент не конкурируют с нативным лигандом дектина-1 человека.

10. Антитело по любому из пп. 7-9, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент представляют собой человеческое или гуманизованное антитело или его фрагмент.

11. Антитело по любому из пп. 7-10, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент конкурируют за связывание с дектином-1 человека с эталонным антителом, которое содержит:

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO: 5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSF PFT (SEQ ID NO:6);

(b) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO: 92) и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSF PFT (SEQ ID NO:6); или

(c) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTV SS (SEQ ID NO:7), и вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий последовательность

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

12. Антитело по любому из пп. 7-11, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент связываются с тем же эпитопом дектина-1 человека, что и эталонное антитело, которое содержит:

(а) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность GYTFDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO: 5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPT (SEQ ID NO:6);

(b) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO: 92) и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPT (SEQ ID NO:6); или

(c) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), включающий последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), и вариабельный домен легкой цепи (VL), включающий последовательность
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

13. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент связываются с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки и/или гранулоцита.

14. Антитело по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечное антитело, нанотело или scF_v.

15. Антитело по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что антитело дополнительно содержит область F_c.

16. Антитело по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент представляют собой полиспецифическое антитело или его фрагмент.

17. Антитело по п. 16, отличающееся тем, что антитело или его фрагмент представляют собой биспецифическое антитело, фрагмент или диатело, содержащие первый антигенсвязывающий домен, содержащий домены VH и VL, которые связываются с дектином-1 человека, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий вторые домены

VH и VL, которые связываются с представляющей интерес мишенью.

18. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, ковалентно связанное со вторым антителом IgG, содержащим второй антигенсвязывающий домен.

19. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины.

20. Антитело по п. 19, отличающееся тем, что первая область Fc содержит замену T366W, и при этом вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

21. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих впадины, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих выступы.

22. Антитело по п. 21, отличающееся тем, что первая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, и при этом вторая область Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

23. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена в ассоциации с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, соединенную с доменом VH второго антигенсвязывающего домена.

24. Антитело по п. 23, отличающееся тем, что первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или при этом вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины.

25. Антитело по п. 23 или п. 24, отличающееся тем, что первое плечо антитела содержит первый линкер между доменами VH и VL, и второй линкер между доменом VL и первой областью Fc.

26. Антитело по п. 25, отличающееся тем, что первый линкер содержит один или

более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 26).

27. Антитело по п. 26, отличающееся тем, что первый линкер включает последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 27) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 28).

28. Антитело по любому из пп. 25-27, отличающееся тем, что второй линкер включает последовательность EPKRSDKTHTCPPC (SEQ ID NO: 29) или SATHTCPPC (SEQ ID NO: 30).

29. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, связанный с биотином или его авидин-связывающим производным, и второе антитело IgG, содержащее второй антигенсвязывающий домен, связанный с авидином, стрептавидином, нейтравидином или его биотин-связывающим производным, при этом биотин или его авидин-связывающее производное связано с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным.

30. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, связанный с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, и второе антитело IgG, содержащее второй антигенсвязывающий домен, связанный с биотином, или его авидин-связывающим производным, при этом биотин или его авидин-связывающее производное связано с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным.

31. Антитело по любому из пп. 17-30, отличающееся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

32. Антитело по п. 31, отличающееся тем, что патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат, частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку PLC2 или воспалительную иммунную клетку.

33. Антитело по п. 32, отличающееся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки PLC2 или воспалительной иммунной клетки.

34. Антитело по п. 32, отличающееся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса.

35. Антитело по п. 31 или п. 32, отличающееся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки.

36. Антитело по п. 35, отличающееся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR.

37. Антитело по п. 32, отличающееся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой бета-амилоид, амилоид легкой цепи лямбда или амилоид легкой цепи

каппа.

38. Антитело по любому из пп. 15-37, отличающееся тем, что антитело содержит две тяжелые цепи антитела, и при этом каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU.

39. Антитело по п. 38, отличающееся тем, что каждая из тяжелых цепей антитела содержит замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU.

40. Антитело по любому из пп. 17-39, отличающееся тем, что антитело содержит две тяжелые цепи антитела, и при этом только одна из тяжелых цепей антитела содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU.

41. Антитело по любому из пп. 17-40, отличающееся тем, что антитело содержит два плеча, при этом только одно из двух плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU.

42. Антитело по п. 17, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH второй тяжелой цепи антитела образует антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, и при этом тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU.

43. Антитело по п. 42, отличающееся тем, что тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU.

44. Антитело по любому из пп. 17-43, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит тяжелые цепи первого и второго антитела, при этом тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека.

45. Антитело по любому из пп. 17-44, отличающееся тем, что биспецифическое антитело содержит тяжелые цепи первого и второго антитела, при этом по меньшей мере одна или две из тяжелых цепей первого и второго антитела являются нефукозилированными.

46. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая:

(а) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека; и

(б) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается с представляющей интерес мишенью.

47. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 46, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

48. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 47, отличающаяся тем, что патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат, частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку.

49. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 48, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки.

50. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 48, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса.

51. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 47 или п. 48, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки.

52. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 51, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR.

53. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 48, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой бета-амилоид, амилоид легкой цепи лямбда или амилоид легкой цепи каппа.

54. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-53, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

55. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-53, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

56. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-53, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), при этом домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность DYYI (SEQ ID NO:88), CDR-H2, включающую последовательность WINPNSGDTNYAQKFQG (SEQ ID NO:89), и CDR-H3, включающую последовательность NSGSYSFGY (SEQ ID NO:90), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO:91), CDR-L2, включающую последовательность GASSLQS (SEQ ID NO:92), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

57. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 54-56, отличающаяся тем, что домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

58. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 57, отличающаяся тем, что домен VH включает последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGDTNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

59. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-58, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен:

(а) связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита;

(б) связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности клетки, с EC50 менее 2 нМ;

(с) способен связывать дектин-1 человека или яванского макака; и/или

(д) не конкурирует с нативным лигандом дектина-1 человека.

60. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-59, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:24, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:25.

61. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-59, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с Tgp-2 и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO:42, и домен VL,

включающий последовательность SEQ ID NO:43.

62. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-59, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с амилоидом легкой цепи и содержит домен VH, включающий последовательность SEQ ID NO: 44, и домен VL, включающий последовательность SEQ ID NO:45.

63. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-59, отличающаяся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой человеческие или гуманизированные антитела или их фрагменты.

64. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, нанотела или фрагменты scFv.

65. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов дополнительно содержат домен Fc.

66. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, и при этом второе антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

67. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что и первое, и второе антитела содержат тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

68. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-67, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; или при этом второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; и при этом первое антитело или его фрагмент связаны со вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным и биотином или его авидин-связывающим производным.

69. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 68, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

70. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 68, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело,

связанное с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

71. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что полиспецифическая связывающая молекула содержит первое антитело IgG, содержащее первый антигенсвязывающий домен, ковалентно связанное со вторым антителом IgG, содержащим второй антигенсвязывающий домен.

72. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), содержащий домены VH и VL, которые связываются с дектином-1 человека, и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена в ассоциации с легкой цепью антитела, которая содержит домен VL второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, соединенную с доменом VH второго антигенсвязывающего домена.

73. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 72, отличающаяся тем, что первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины, или при этом вторая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и первая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины.

74. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 72 или п. 73, отличающаяся тем, что первое плечо антитела содержит первый линкер между доменами VH и VL и второй линкер между доменом VL и первой областью Fc.

75. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 74, отличающаяся тем, что первый линкер содержит один или более повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 26).

76. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 75, отличающаяся тем, что первый линкер включает последовательность GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 27) или GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 28).

77. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 74-76, отличающаяся тем, что второй линкер включает последовательность EPKRSDKTHTCPPC (SEQ ID NO: 29) или SATHTCPPC (SEQ ID NO: 30).

78. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и легкую цепь первого антитела, содержащую домен VL первого антигенсвязывающего домена, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена, и вторую область Fc, и легкую цепь второго антитела, содержащую домен VL второго антигенсвязывающего домена, при этом первая

область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины.

79. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 73 или п. 78, отличающаяся тем, что первая область Fc содержит замену T366W, и при этом вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU.

80. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-63, отличающаяся тем, что полиспецифическая связывающая молекула содержит первое плечо антитела, содержащее тяжелую цепь первого антитела, которая содержит домен VH первого антигенсвязывающего домена и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее тяжелую цепь второго антитела, которая содержит домен VH второго антигенсвязывающего домена и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих впадины, а вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих выступы.

81. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 73 или п. 80, отличающаяся тем, что первая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, и при этом вторая область Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

82. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 72-81, отличающаяся тем, что первая и/или вторая область Fc содержит аминокислотную замену в одном или более положениях 234, 235 и 237 в соответствии с нумерацией EU.

83. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 82, отличающаяся тем, что каждая из первой и второй областей Fc содержит замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU.

84. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 78-83, отличающаяся тем, что только одна из областей Fc содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU.

85. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 78-84, отличающаяся тем, что только одно из плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU.

86. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 46, отличающаяся тем, что полиспецифическая связывающая молекула содержит тяжелую цепь первого антитела и легкую цепь первого антитела, а также тяжелую цепь второго антитела и легкую цепь второго антитела, при этом домен VH тяжелой цепи первого антитела образует первый антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи первого антитела, при этом домен VH тяжелой цепи второго антитела образует второй антигенсвязывающий домен с доменом VL легкой цепи второго антитела, при этом тяжелая цепь первого антитела содержит замены F126C, C220V и T366W, при этом легкая цепь первого антитела содержит замены S121C и C214V, и при этом тяжелая цепь второго антитела содержит замены T366S, L368A, Y407V, H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU.

87. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 86, отличающаяся тем, что

тяжелые цепи первого и второго антитела дополнительно содержат замены L234A, L235E и G237A в соответствии с нумерацией EU.

88. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 78-87, отличающаяся тем, что тяжелые цепи первого и второго антитела содержат домены Fc IgG1 человека.

89. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 78-88, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна или две из тяжелых цепей первого и второго антитела являются нефукозилированными.

90. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая:

(a) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с первой представляющей интерес мишенью; и

(b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается со второй представляющей интерес мишенью;

при этом:

(i) первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; или

(ii) второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; и

при этом первое антитело или его фрагмент связаны со вторым антителом или фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным и биотином или их авидин-связывающим производным.

91. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 90, отличающаяся тем, что первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека.

92. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 91, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

93. Полиспецифическая связывающая молекула по 91, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и

CDR-H3 из последовательности домена VH
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
 SS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из
 последовательности домена VL
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

94. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 92 или п. 93, отличающаяся тем, что домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
 SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

95. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 94, отличающаяся тем, что домен VH включает последовательность
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGYSFGYWGGTLVTV
 SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

96. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 91-95, отличающаяся тем, что первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита.

97. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-96, отличающаяся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой гуманизированные антитела или их фрагменты.

98. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-97, отличающаяся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, нанотела или фрагменты scFv.

99. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-97, отличающаяся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов дополнительно содержат домен Fc.

100. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-97, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, и при этом второе антитело или его фрагмент содержат тяжелую цепь антитела и

легкую цепь антитела.

101. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-97, отличающаяся тем, что первое и второе антитела или их фрагменты представляют собой полноразмерные антитела.

102. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-97, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

103. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-97, отличающаяся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело, связанное с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело или его фрагмент представляют собой биотинилированное полноразмерное антитело.

104. Полиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 46-103, отличающаяся тем, что первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека, и при этом вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

105. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 104, отличающаяся тем, что патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат, частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ILC2 или воспалительную иммунную клетку.

106. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 105, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ILC2 или воспалительной иммунной клетки.

107. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 105, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса.

108. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 104 или п. 105, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки.

109. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 108, отличающаяся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR.

110. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 109, отличающаяся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20; при этом второй антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGD

TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSA (SEQ ID NO:24) и/или при этом домен VL второго антигенсвязывающего
домена включает последовательность
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVQKPGSSPKWIYATSNLASGVVPRF
SGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25).

111. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 109, отличающаяся тем, что
второй антигенсвязывающий домен связывается с Trop-2; при этом второй
антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и
переменный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго
антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ ID NO:42, и/или при
этом домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ
ID NO:43.

112. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 109, отличающаяся тем, что
второй антигенсвязывающий домен связывается с амилоидом легкой цепи; при этом
второй антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и
переменный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго
антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ ID NO:44, и/или при
этом домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ
ID NO:45.

113. Полиспецифическая связывающая молекула по п. 105, отличающаяся тем, что
представляющая интерес мишень представляет собой бета-амилоид, амилоид легкой цепи
лямбда или амилоид легкой цепи каппа.

114. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая первое плечо,
содержащее первый антигенсвязывающий домен, и второе плечо, содержащее второй
антигенсвязывающий домен; при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с
дектином-1 человека, а второй антигенсвязывающий домен связывается с
представляющей интерес мишенью; и при этом первое плечо содержит полипептидную
цепь, включающую последовательность
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPPTF
GPGTKVDIEEPKRSKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31).

115. Полиспецифическая связывающая молекула, содержащая:

(а) первую полипептидную цепь, включающую последовательность
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD

TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGGTGLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ
QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF
GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG (SEQ ID NO:31);

(b) вторую полипептидную цепь, включающую последовательность
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD
TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAG
TTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32); и

(c) третью полипептидную цепь, включающую последовательность
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVVPRF
SGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33).

116. Полинуклеотид, кодирующий антитело или полиспецифическую связывающую молекулу по любому из пп. 1-115.

117. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 116.

118. Выделенная клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 116 или вектор по п. 117.

119. Выделенная клетка-хозяин по п. 118, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой дрожжевую клетку, клетку насекомого, растения или прокариотическую клетку.

120. Выделенная клетка-хозяин по п. 118, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

121. Выделенная клетка-хозяин по п. 120, отличающаяся тем, что клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

122. Выделенная клетка-хозяин по п. 120 или п. 121, отличающаяся тем, что клетка-хозяин имеет нокаут альфа-1,6-фукозилтрансферазы (Fut8) или альфа-1,3-маннозилгликопротеин-2-бета-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы (MGAT1).

123. Выделенная клетка-хозяин по п. 120 или п. 121, отличающаяся тем, что клетка-хозяин сверхэкспрессирует β 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III (GnT-III).

124. Выделенная клетка-хозяин по п. 123, отличающаяся тем, что клетка-хозяин

дополнительно сверхэкспрессирует μ -маннозидазу II аппарата Гольджи (ManII).

125. Способ получения антитела или полиспецифической связывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из пп. 118-124 в условиях, подходящих для получения антитела или полиспецифической связывающей молекулы.

126. Способ по п. 125, дополнительно включающий выделение антитела или полиспецифической связывающей молекулы.

127. Способ по п. 125 или п. 126, отличающийся тем, что перед продуцированием антитела или полиспецифической связывающей молекулы клетку-хозяина обрабатывают кифунензином.

128. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с дектином-1 человека, полученные с помощью способа по любому из пп. 125-127.

129. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или полиспецифическую связывающую молекулу по любому из пп. 1-115 и 128 и фармацевтически приемлемый носитель.

130. Способ получения полиспецифической связывающей молекулы, включающий:

(а) обеспечение первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с первой представляющей интерес мишенью;

(b) обеспечение второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается со второй представляющей интерес мишенью;

при этом:

(i) первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; или

(ii) второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; и

(с) приведение в контакт первого антитела или его фрагмента со вторым антителом или его фрагментом в условиях, подходящих для связывания между первым антителом или его фрагментом и вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, и биотином или его авидин-связывающим производным, в результате чего образуется полиспецифическая связывающая молекула.

131. Способ идентификации полиспецифической связывающей молекулы, которая связывает первую и вторую представляющие интерес мишени, включающий:

(а) обеспечение первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащих первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с первой представляющей интерес мишенью;

(b) обеспечение второго антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,

содержащих второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается со второй представляющей интерес мишенью;

при этом:

(i) первое антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а второе антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным; или

(ii) второе антитело или его фрагмент связаны с авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, а первое антитело или его фрагмент связаны с биотином или его авидин-связывающим производным;

(c) приведение в контакт первого антитела или его фрагмента со вторым антителом или его фрагментом в условиях, подходящих для связывания между первым антителом или его фрагментом и вторым антителом или его фрагментом посредством взаимодействия между авидином, стрептавидином, нейтравидином или их биотин-связывающим производным, и биотином или его авидин-связывающим производным, в результате чего образуется полиспецифическая связывающая молекула; и

(d) измерение связывания между полиспецифической связывающей молекулой и по меньшей мере одной из первой и второй представляющих интерес мишеней.

132. Способ по п. 130 или п. 131, отличающийся тем, что первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека.

133. Способ по п. 132 отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

134. Способ по 132, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена

VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGTLVTV
 SS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из
 последовательности

домена

VL

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

135. Способ по п. 133 или п. 134, отличающийся тем, что домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTV
 SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность, имеющую по
 меньшей мере 90% идентичности с последовательностью
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

136. Способ по п. 135, отличающийся тем, что домен VH включает последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGGTLVTV
 SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

137. Способ по любому из пп. 132-136, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека, экспрессируемым на поверхности макрофага, моноцита, дендритной клетки или гранулоцита.

138. Способ по любому из пп. 130-137, отличающийся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой гуманизированные антитела или их фрагменты.

139. Способ по любому из пп. 130-138, отличающийся тем, что одно или оба из первого и второго антител или их фрагментов представляют собой Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, Fab'-SH, F(ab')₂, одноцепочечные антитела, нанотела или фрагменты scFv.

140. Способ по любому из пп. 130-138, отличающийся тем, что одно или оба из первого и второго антител или фрагментов дополнительно содержат домен Fc.

141. Способ по любому из пп. 130-138, отличающийся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, и при этом второе антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

142. Способ по любому из пп. 130-138, отличающийся тем, что и первое, и второе антитела содержат тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

143. Способ по любому из пп. 130-138, отличающийся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой фрагмент Fab, связанный с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело или его фрагмент представляют собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

144. Способ по любому из пп. 130-138, отличающийся тем, что первое антитело или его фрагмент представляют собой полноразмерное антитело, связанное с мономерным стрептавидином (mSA), и при этом второе антитело представляет собой биотинилированное антитело, содержащее тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела.

145. Способ по любому из пп. 130-144, отличающийся тем, что вторая

представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

146. Способ по п. 145, отличающийся тем, что патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат, частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ПС2 или воспалительную иммунную клетку.

147. Способ по п. 146, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ПС2 или воспалительной иммунной клетки.

148. Способ по п. 146, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса.

149. Способ по п. 145 или п. 146, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки.

150. Способ по п. 149, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR.

151. Способ по п. 146, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой бета-амилоид, амилоид легкой цепи лямбда или амилоид легкой цепи каппа.

152. Способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение эффективного количества антитела по любому из пп. 1-44, полиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 46-88 и 104-115, или композиции по пп. 129 нуждающемуся в этом индивиду.

153. Способ по п. 152, отличающийся тем, что первая представляющая интерес мишень представляет собой дектин-1 человека, и при этом вторая представляющая интерес мишень представляет собой патогенный агент.

154. Способ по п. 153, отличающийся тем, что патогенный агент представляет собой бактериальную клетку, грибковую клетку, вирус, стареющую клетку, опухолевую клетку, белковый агрегат, частицу ЛПНП, тучную клетку, эозинофил, клетку ПС2 или воспалительную иммунную клетку.

155. Способ по п. 154, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности бактериальной клетки, грибковой клетки, стареющей клетки, опухолевой клетки, тучной клетки, эозинофила, клетки ПС2 или воспалительной иммунной клетки.

156. Способ по п. 154, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой поверхностный антиген вируса.

157. Способ по любому из пп. 151-156, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой рак, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, вирусную инфекцию, мастоцитоз или болезнь тучных клеток, системный мастоцитоз, амилоидоз или связанное со старением заболевание или нарушение.

158. Способ по любому из пп. 151-157, отличающийся тем, что представляющая интерес мишень представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности раковой клетки.

159. Способ по п. 158, отличающийся тем, что вторая представляющая интерес мишень представляет собой CD70, HER2, DLL3, нектин-4, TROP-2, мезотелин, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR.

160. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества композиции, содержащей полиспецифическую связывающую молекулу, нуждающемуся в этом индивиду, при этом полиспецифическая связывающая молекула содержит:

(a) первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый антигенсвязывающий домен, при этом первый антигенсвязывающий домен связывается с дектином-1 человека; и

(b) второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие второй антигенсвязывающий домен, при этом второй антигенсвязывающий домен связывается с CD70, HER2, DLL3, нектином-4, TROP-2, мезотелином, LIV-1, C-MET, FOLR1, CD20, CCR8, CD33 или EGFR.

161. Способ по п. 160 отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, включающую последовательность GYTFTDYY (SEQ ID NO:1), CDR-H2, включающую последовательность INPNSGDT (SEQ ID NO:2), и CDR-H3, включающую последовательность ARNSGSYSFGY (SEQ ID NO:3), и при этом домен VL содержит CDR-L1, включающую последовательность QGISSW (SEQ ID NO:4), CDR-L2, включающую последовательность GAS (SEQ ID NO:5), и CDR-L3, включающую последовательность QQAYSFPFT (SEQ ID NO:6).

162. Способ по 160, отличающийся тем, что первый антигенсвязывающий домен содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), причем домен VH содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена

VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTV
 SS (SEQ ID NO:7), и при этом домен VL содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности

домена VL

DIQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

163. Способ по п. 161 или п. 162, отличающийся тем, что домен VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с последовательностью

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSGSYSFGYWGQGLTVTV
 SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL включает последовательность, имеющую по

меньшей мере 90% идентичности с последовательностью
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

164. Способ по п. 163, отличающийся тем, что домен VH первого антигенсвязывающего домена включает последовательность
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD
 TNYAQKFKGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGYSFGYWGQGLTVTV
 SS (SEQ ID NO:7); и/или при этом домен VL первого антигенсвязывающего домена
 включает последовательность
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPS
 RFGSGSGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQAYSFPTFGPGTKVDIE (SEQ ID NO:8).

165. Способ по любому из пп. 160-164, отличающийся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20; при этом второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность
 QVQLQPPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPPGNGD
 TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAG
 TTVTVA (SEQ ID NO:24) и/или при этом домен VL второго антигенсвязывающего
 домена включает последовательность
 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWVQKPGSSPKPWYATSNLASGVVRF
 SFGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25).

166. Способ по любому из пп. 160-164, отличающийся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с Trop-2; при этом второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ ID NO:42, и/или при этом домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ ID NO:43.

167. Способ по любому из пп. 160-164, отличающийся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с амилоидом легкой цепи; при этом второй антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL); и при этом домен VH второго антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ ID NO:44, и/или при этом домен VL второго антигенсвязывающего домена включает последовательность SEQ ID NO:45.

168. Способ по любому из пп. 160-167, отличающийся тем, что:

(а) полиспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее первый антигенсвязывающий домен и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее второй антигенсвязывающий домен и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих выступы, и вторая область Fc

содержит одну или более родственных мутаций, образующих впадины; или

(b) полиспецифическое антитело содержит первое плечо антитела, содержащее первый антигенсвязывающий домен и первую область Fc, и второе плечо антитела, содержащее второй антигенсвязывающий домен и вторую область Fc, при этом первая область Fc содержит одну или более мутаций, образующих впадины, и вторая область Fc содержит одну или более родственных мутаций, образующих выступы.

169. Способ по п. 168, отличающийся тем, что:

(a) при этом первая область Fc содержит замену T366W, и при этом вторая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V в соответствии с нумерацией EU; или

(b) первая область Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V, и при этом вторая область Fc содержит замену T366W в соответствии с нумерацией EU.

170. Способ по любому из пп. 160-169, отличающийся тем, что антитело содержит две тяжелые цепи антитела, и при этом только одна из тяжелых цепей антитела содержит замены H435R и Y436F в соответствии с нумерацией EU.

171. Способ по любому из пп. 160-170, отличающийся тем, что только одно из плеч антитела содержит тяжелую цепь, содержащую замены F126C и C220V, и легкую цепь, содержащую замены S121C и C214V, в соответствии с нумерацией EU.

172. Способ по любому из пп. 160-171, отличающийся тем, что первая и вторая тяжелые цепи антитела содержат домены Fc IgG1 человека.

173. Способ по любому из пп. 160-164, отличающийся тем, что второй антигенсвязывающий домен связывается с CD20; и при этом полиспецифическая связывающая молекула содержит три полипептидные цепи:

(a) первую полипептидную цепь, включающую последовательность QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKSSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGD TNYAQKFQGRITMTRDTSISTAYLELSRLRSDDTAVFYCARNSSGSYSFGYWGGTGLVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQ QKPGKAPKLLIFGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTVSSLQPEDFATYYCQQAYSFPFTF GPGTKVDIEPKRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG (SEQ ID NO:31);

(b) вторую полипептидную цепь, включающую последовательность QVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGD TSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAG TTVTVAASSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL

VSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32); и

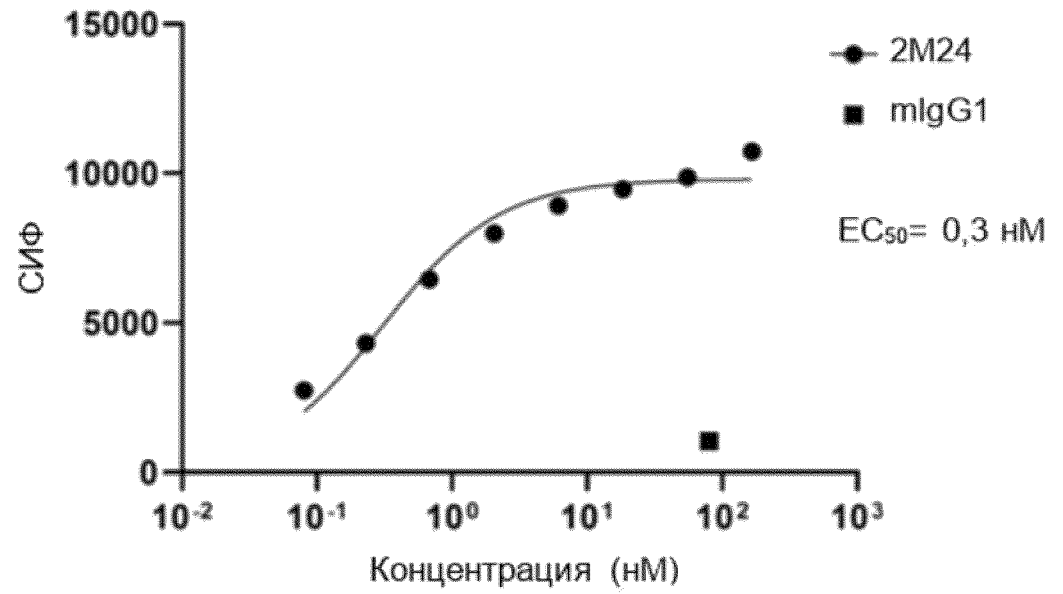
(с) третью полипептидную цепь, включающую последовательность
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRF
SGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33).

174. Способ по любому из пп. 160-173, отличающийся тем, что по меньшей мере одна или две из первой и второй тяжелых цепей антитела являются нефукозилированными.

175. Способ по любому из пп. 151-174, отличающийся тем, что индивид представляет собой человека.

По доверенности

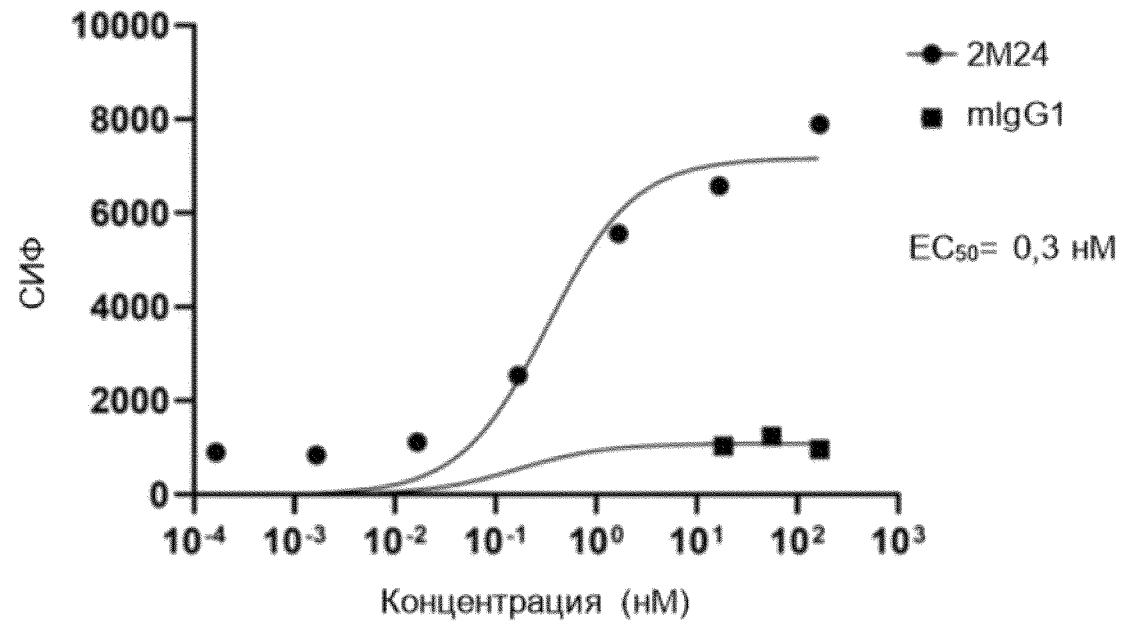
Связывание 2M24 с моноцитами человека



1/104

Фиг. 1А

Связывание с моноцитами яванских макак

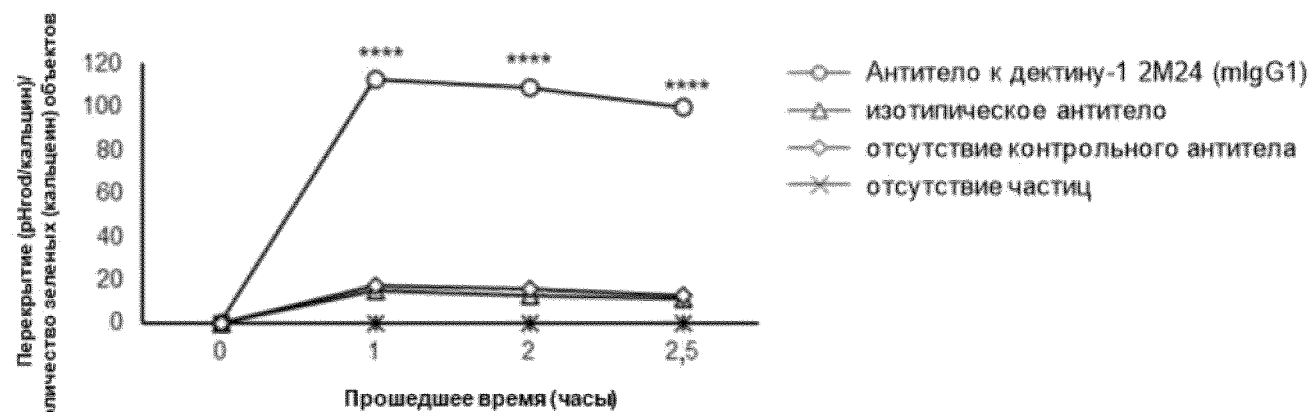


Фиг. 1В

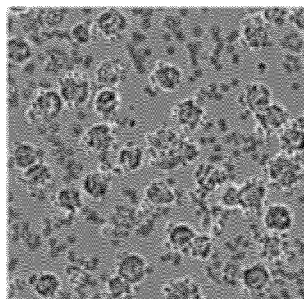
| Клон Ат к дектину-1 | Клетки HEK-Blue hDectin-1a, EC50 (нМ) | Клетки HEK-Blue hDectin-1b, EC50 (нМ) | HEK293FhDectin- 1a FL, EC50 (нМ) | Моноциты человека, EC50 (нМ) | Моноциты яванского макака, EC50 (нМ) |
|------------------------|--|---|-------------------------------------|---------------------------------|---|
| 2M24 | 0,4 | 1 | 1,1 | 0,3 | 0,3 |
| 2M08 | 2,6 | >190 | 1,9 | >190 | Н/Д |
| 2M12 | 16,9 | >142 | 2,8 | >142 | Н/Д |
| 2M38 | 4,5 | >96 | 6,1 | >96 | Н/Д |
| 2M49 | >169 | >169 | >169 | >169 | Н/Д |
| 15E2 | 1,2 | 9,3 | 1,4 | 0,6 | 14 |
| 259931 | 0,8 | 0,9 | 1,2 | 0,3 | 16,5 |
| GE2 | 1,9 | 12 | 2,4 | 1,4 | Н/Д |

Фиг. 1С

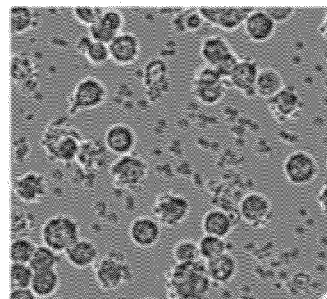
Фагоцитоз в течение 2,5 часов клетками HEK-Blue hDectin-1a



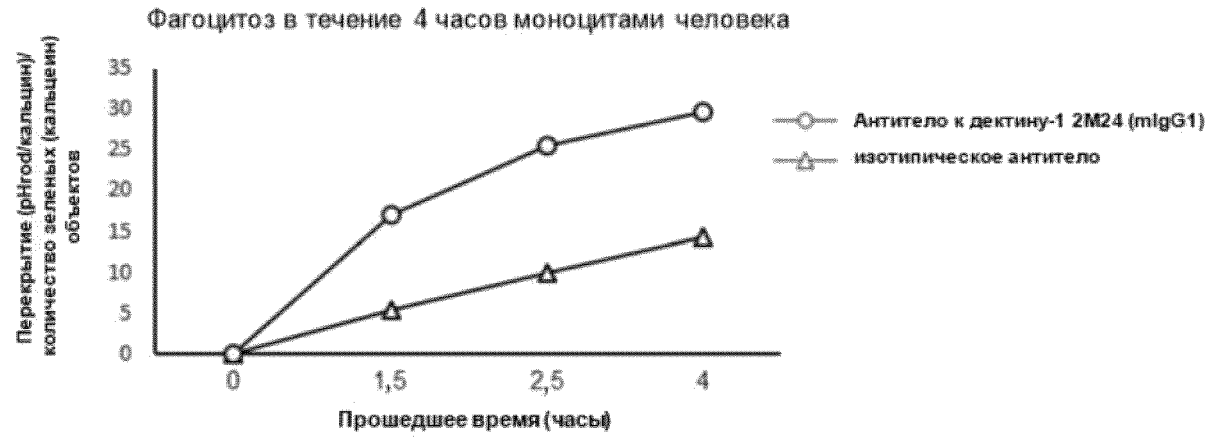
Изотипическое антитело



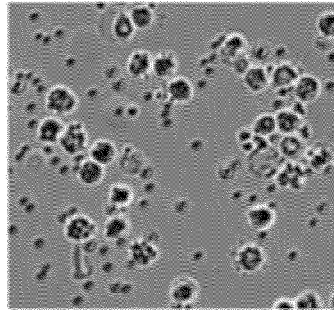
Антитело к дектину-1 2M24 (mlgG1)



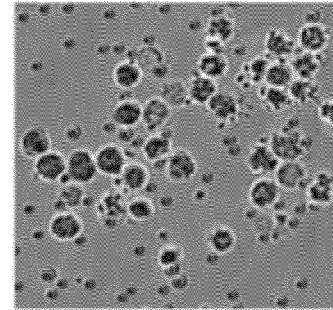
Фиг. 2А



Изотипическое антитело

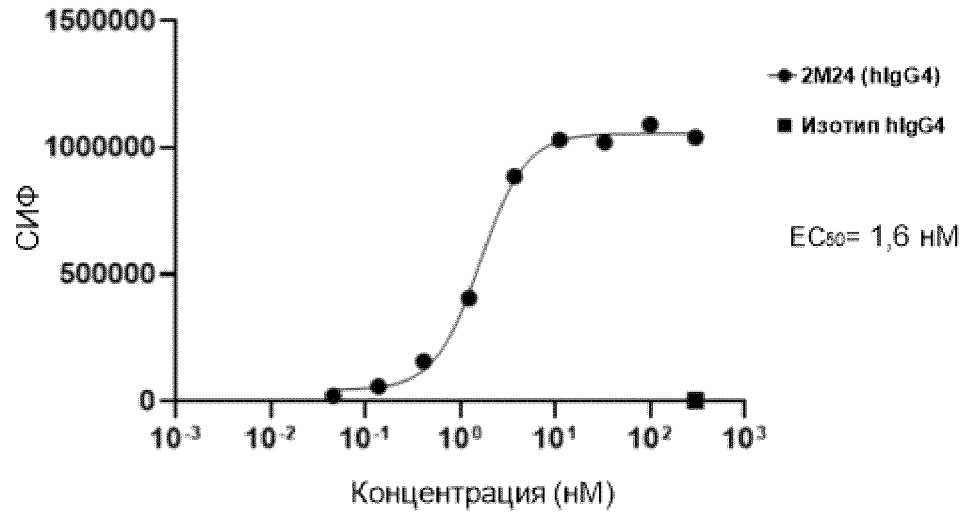


Антитело к дектину-1 2M24 (mIgG1)



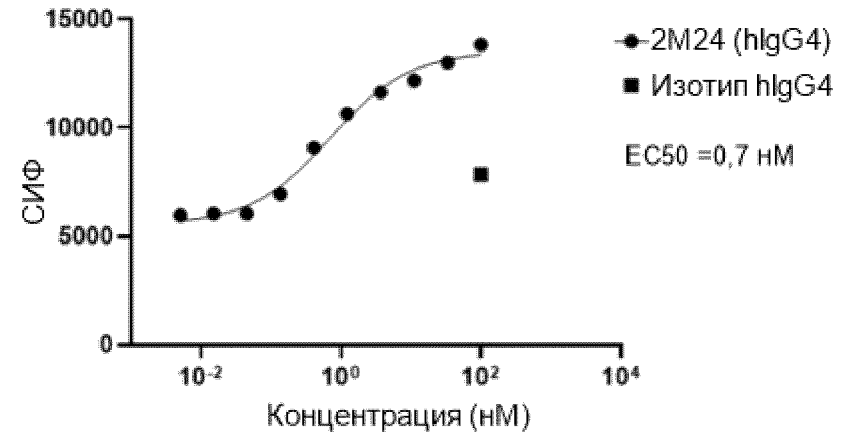
Фиг. 2В

Связывание 2M24 (hlgG4) с клетками HEK-Blue hDectin-1a



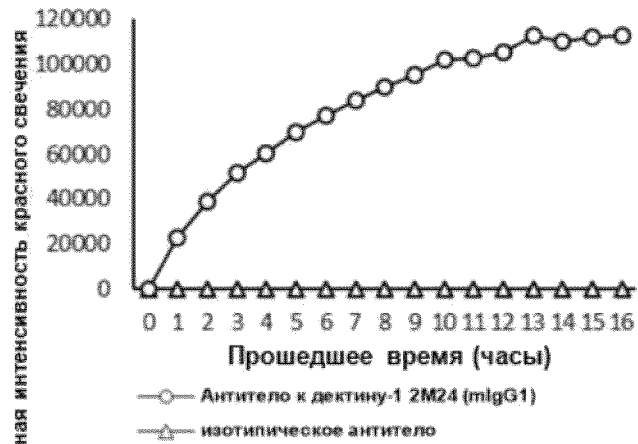
Фиг. 3А

Связывание 2M24 (hlgG4) с моноцитами человека

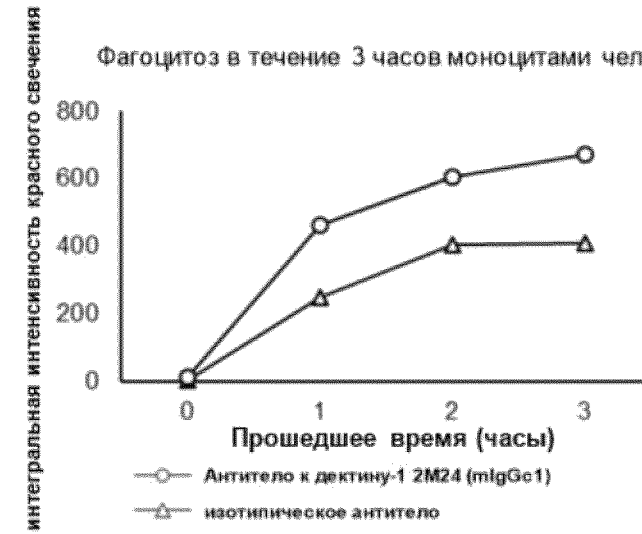


Фиг. 3В

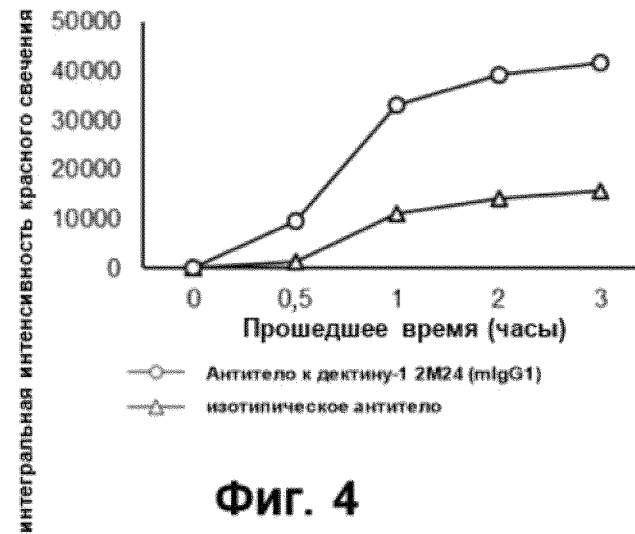
Фагоцитоз в течение 16 часов клетками HEK-Blue hDectin-1a



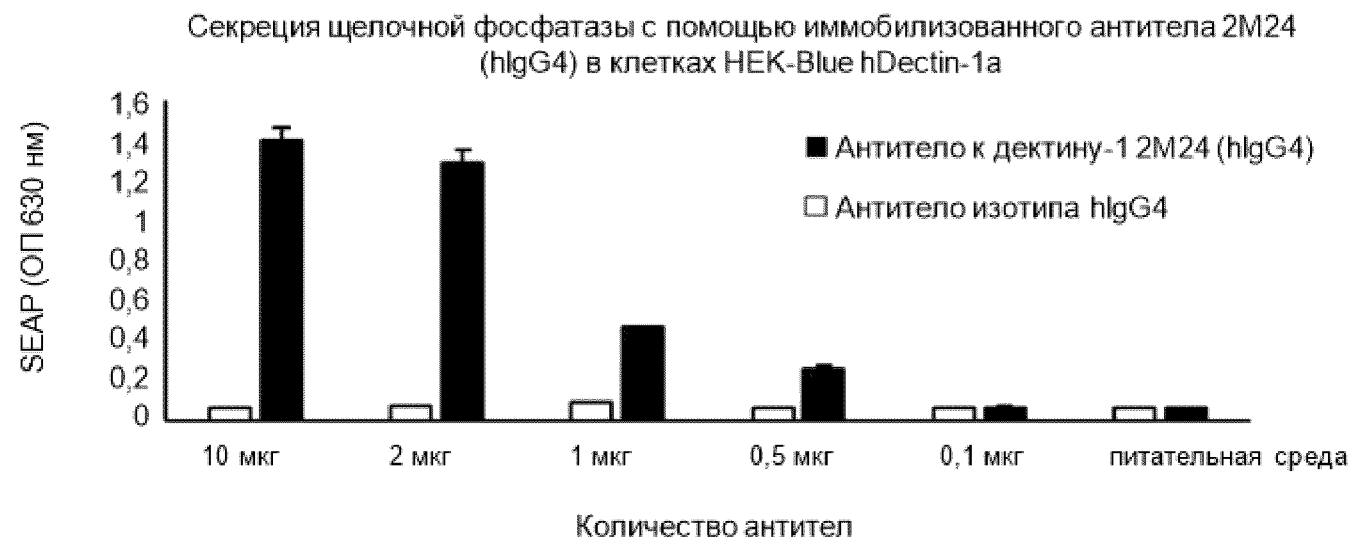
Фагоцитоз в течение 3 часов моноцитами человека



Фагоцитоз в течение 3 часов макрофагами человека

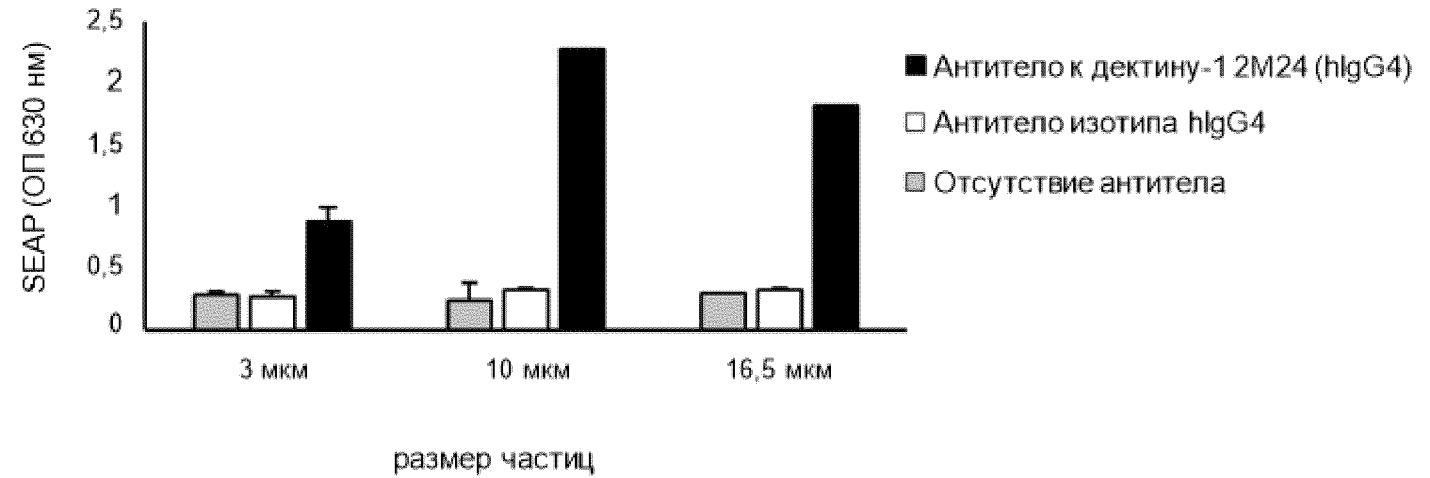


Фиг. 4



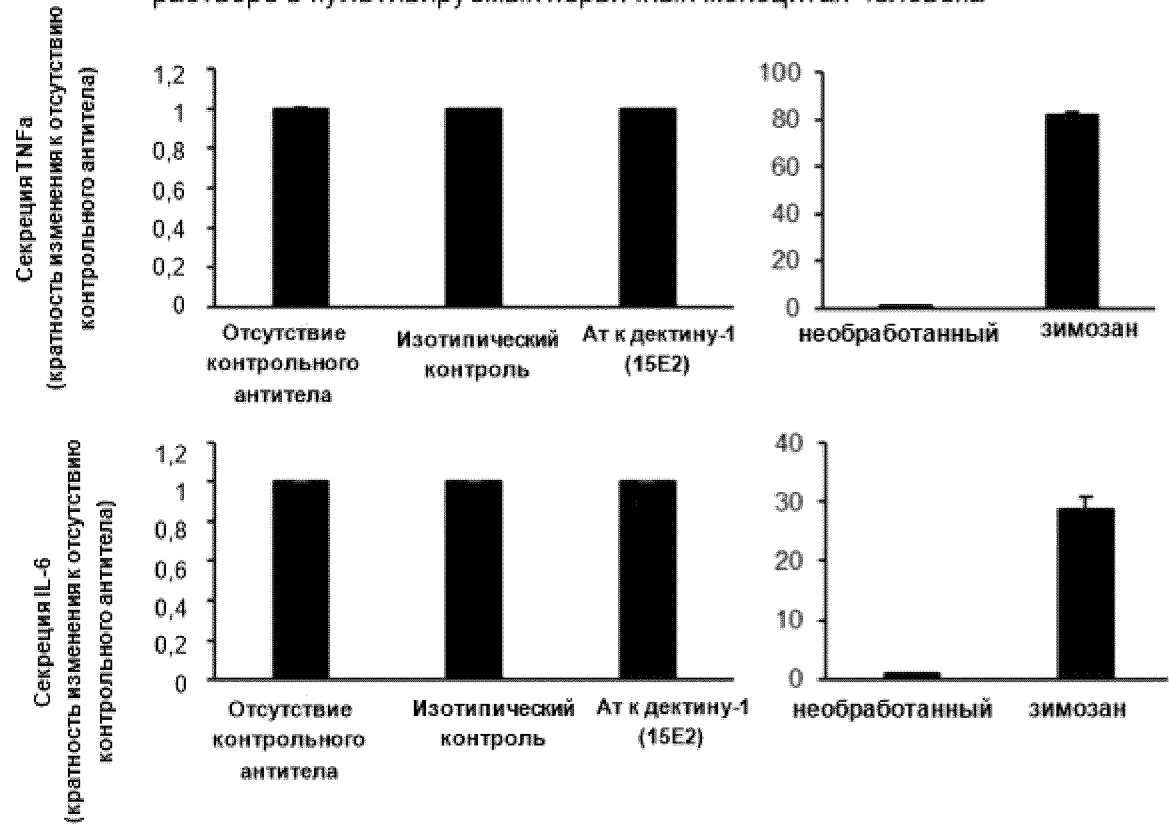
Фиг. 5А

Секреция щелочной фосфатазы с помощью частиц разного размера, конъюгированными с антителом 2M24 (hlgG4) в клетках HEK-Blue hDectin-1a



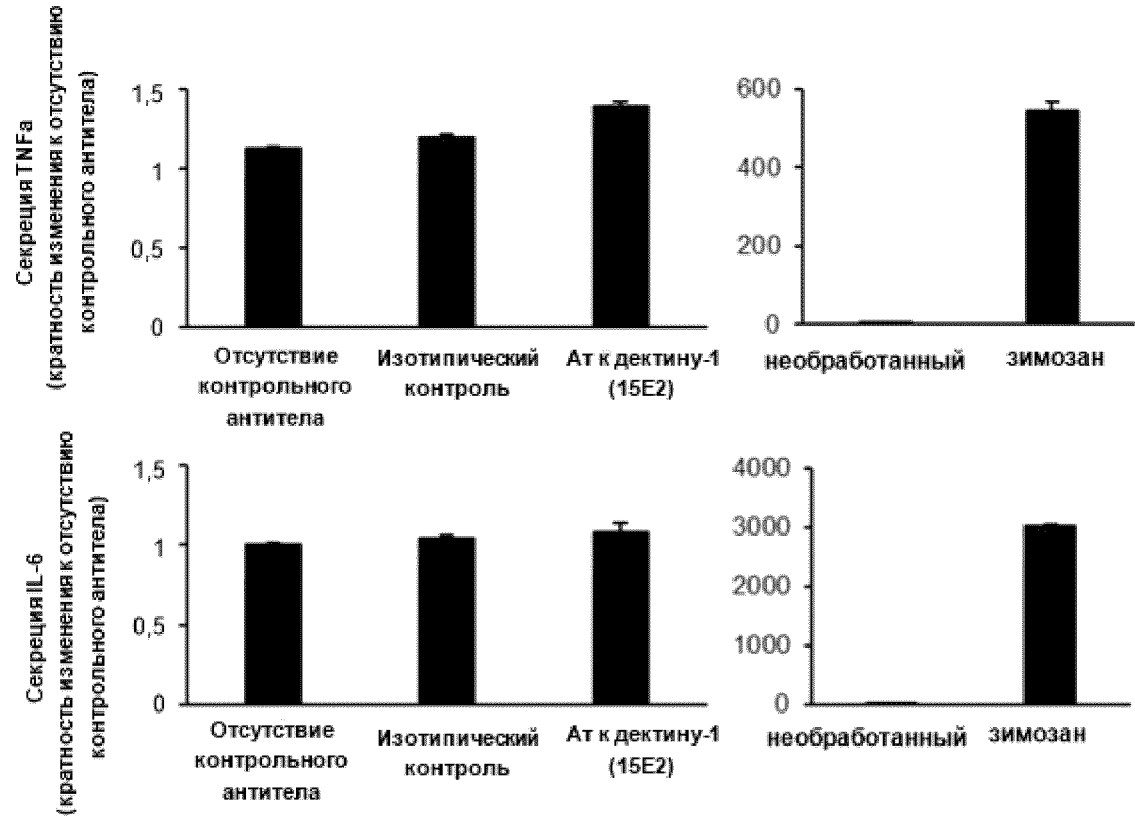
Фиг. 5В

Секреция цитокинов для агонистического Ат к дектину-1 15E2) в растворе в культивируемых первичных моноцитах человека



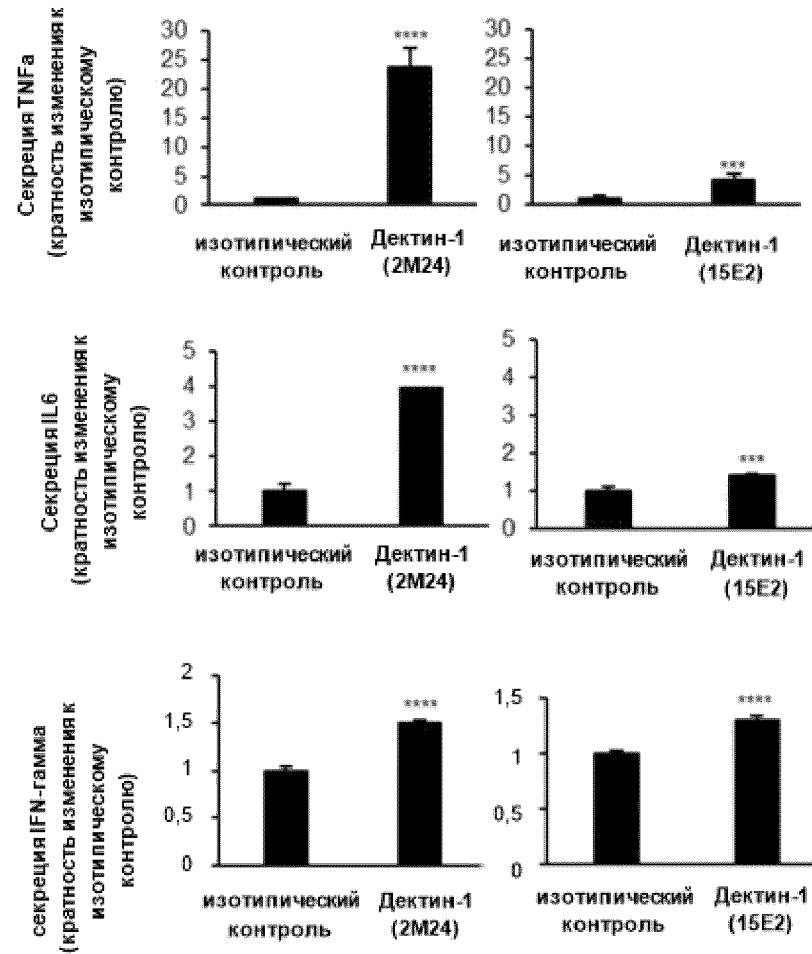
Фиг. 6А

Секреция цитокинов для агонистического Ат к дектину-1 15E2) в растворе в культивируемых первичных макрофагах человека



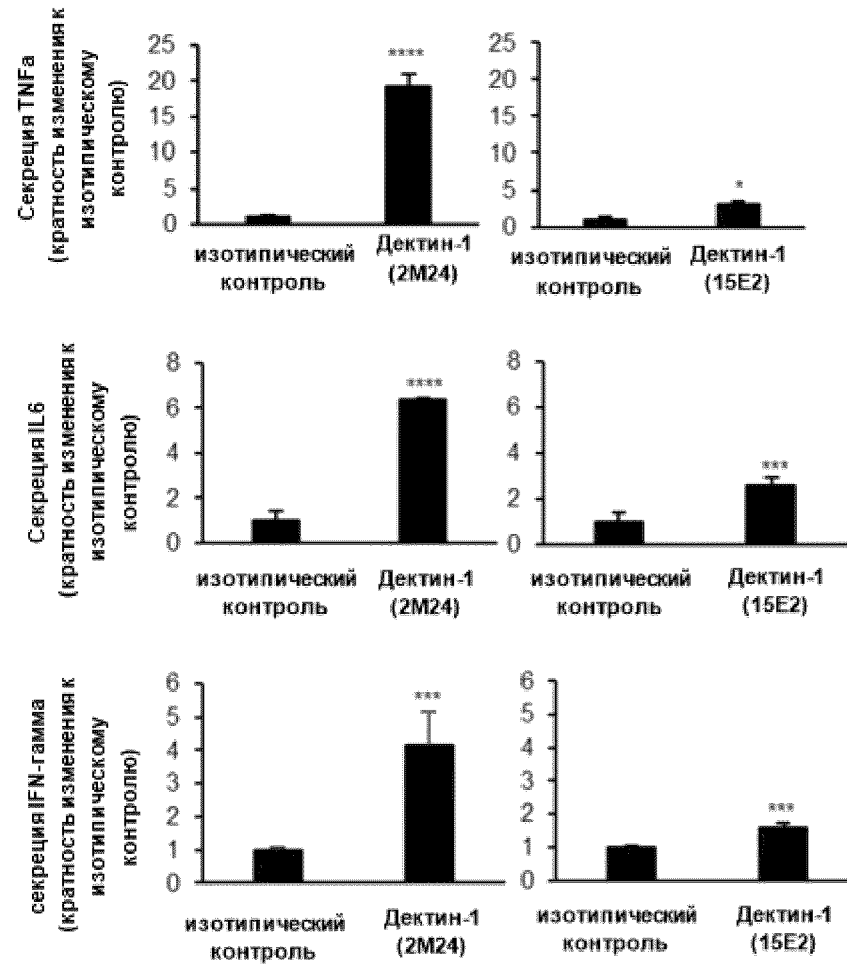
Фиг. 6В

Секреция цитокинов для иммобилизованного агонистического Ат к дектину-1 в культивируемых первичных моноцитах человека

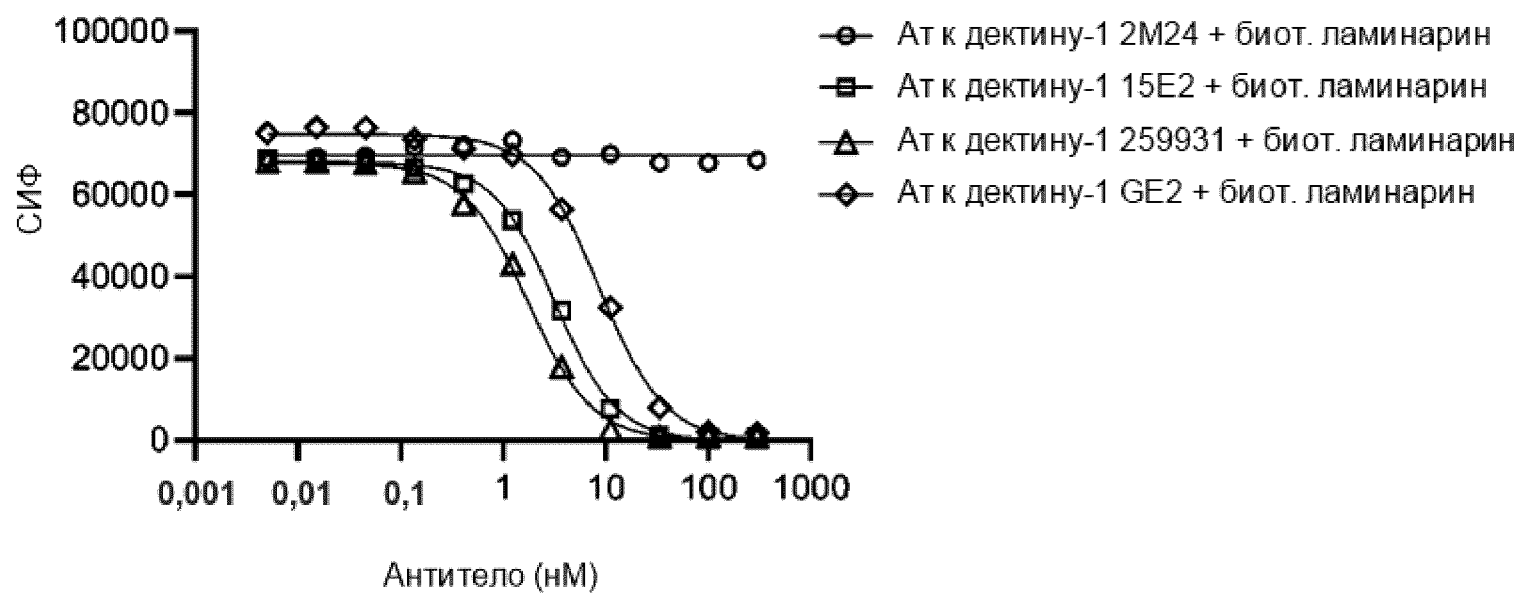


Фиг. 7А

Секреция цитокинов для иммобилизованного агонистического Ат к дектину-1 в культивируемых первичных РВМС человека



Фиг. 7В

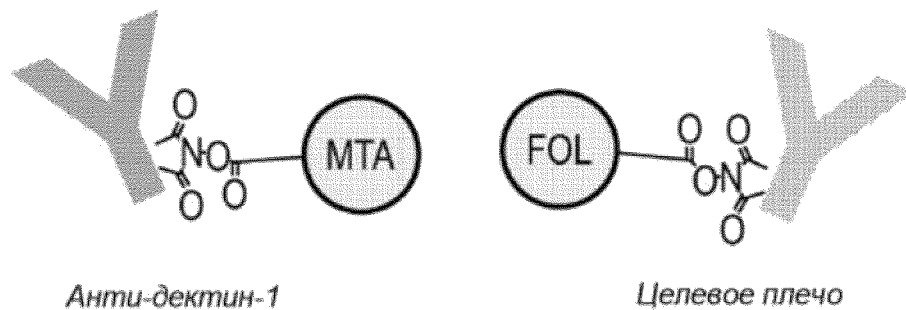


Фиг. 8

| Клон антитела к дектину-1 | Клетки HEK-Blue hDectin-1a, EC50 (нМ) | Клетки HEK-Blue hDectin-1b, EC50 (нМ) | HEK293F hDectin-1a FL EC50 (нМ) | Моноциты человека EC50 (нМ) | Конкуренция с природными лигандами | Секреция TNFα в PBMC (кратность изменения к изотипу) | Секреция IL6 в PBMC (кратность изменения к изотипу) | Секреция IFN-γ в PBMC (кратность изменения к изотипу) | Фагоцитоз |
|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|--|---|---|-----------|
| 2M24 | 0,4 | 1 | 1,1 | 0,3 | Отсутствие | 19 | 6,4 | 4,1 | Да |
| 15E2 | 1,2 | 9,3 | 1,4 | 0,6 | Да | 3 | 2,6 | 1,6 | Да |

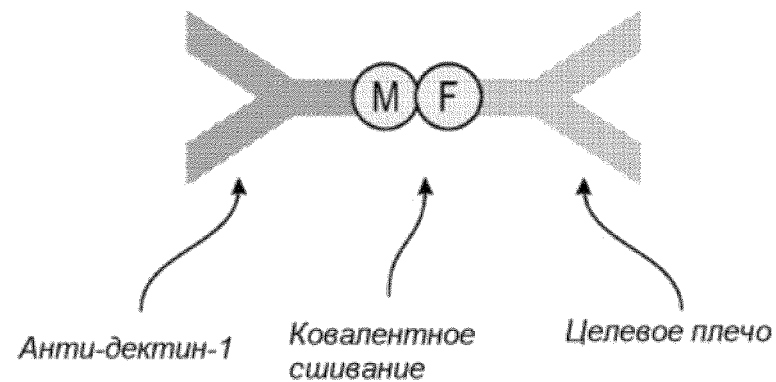
Фиг. 9

Дифференциальное мечение антител с помощью MTA или FOL

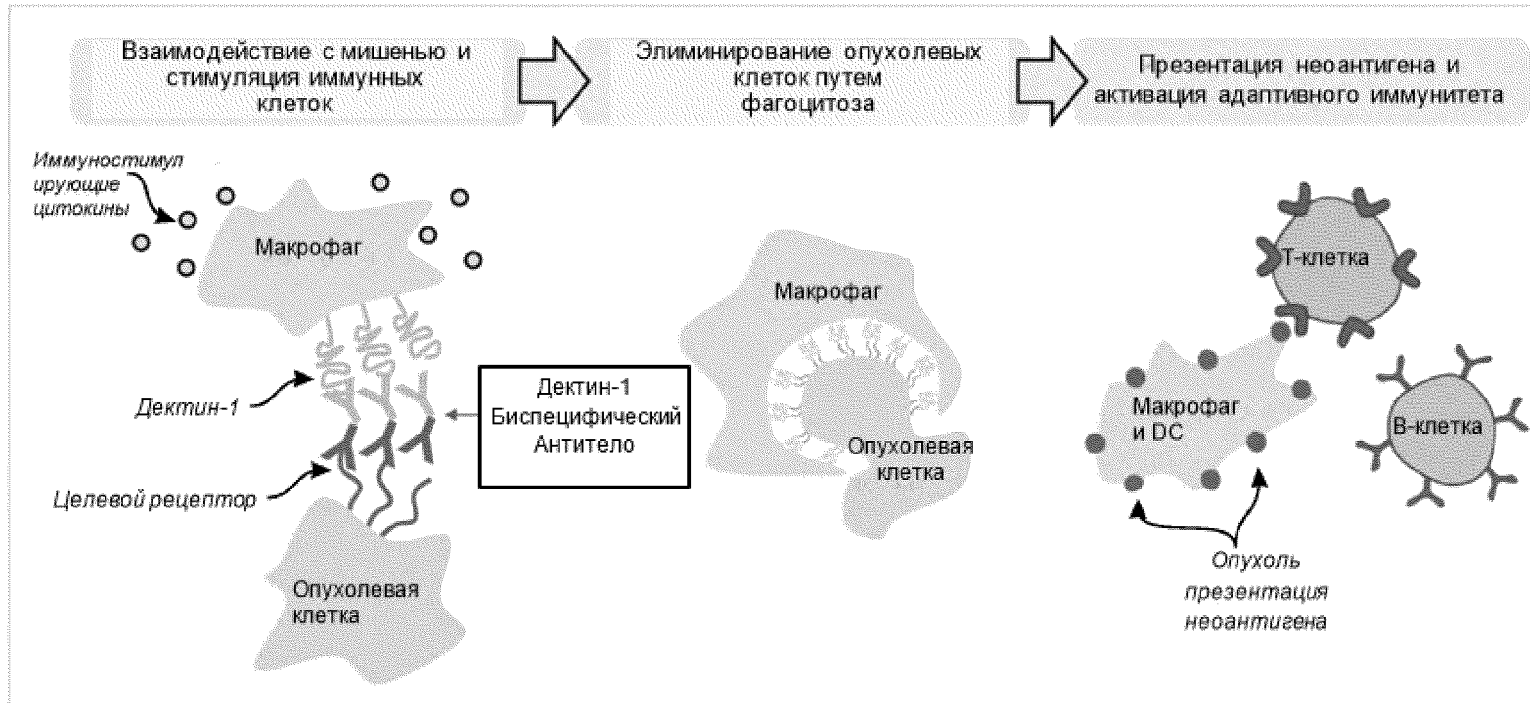


Фиг. 10А

Ковалентное сшивание антител через специфические взаимодействия MTA-FOL



Фиг. 10В

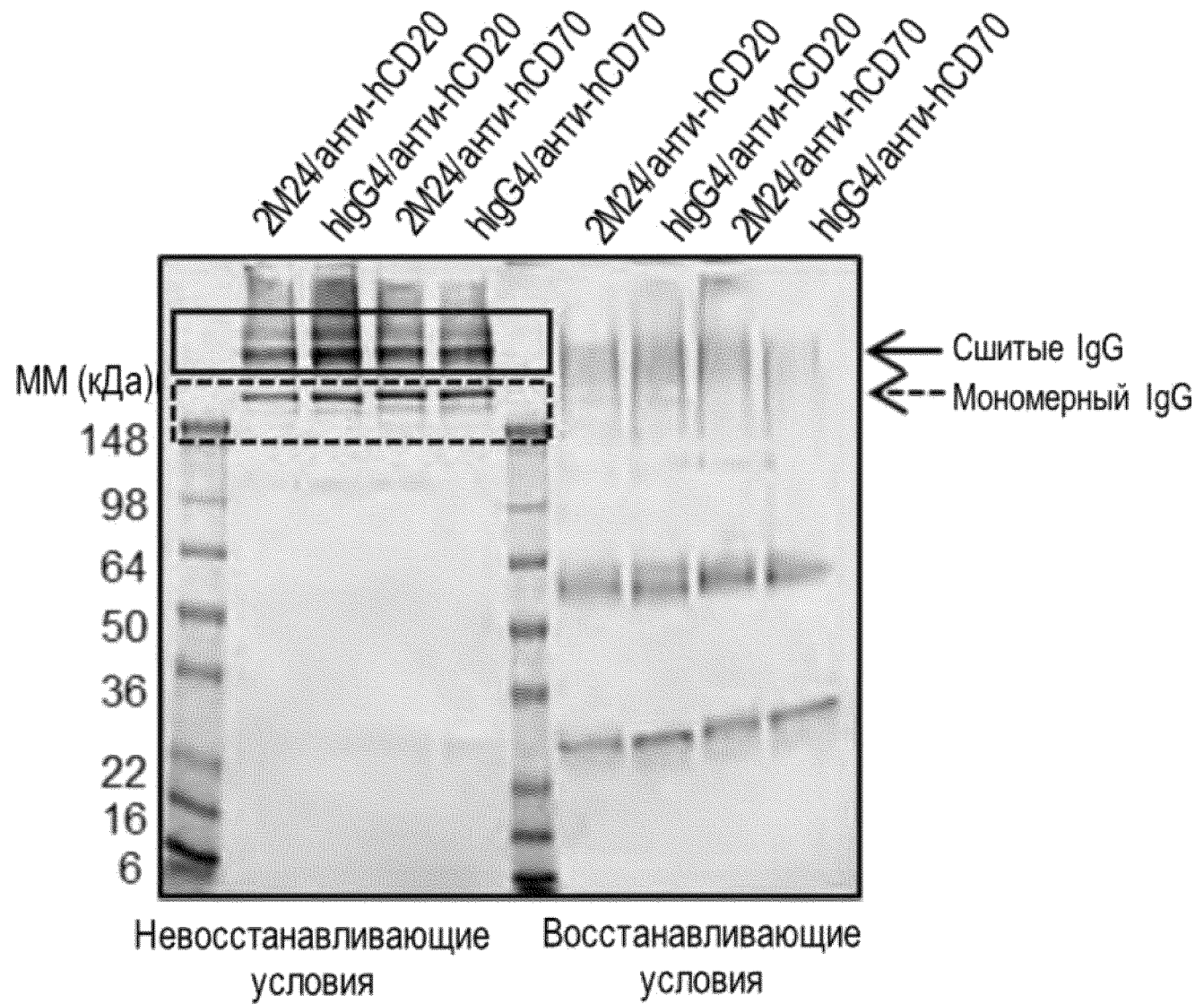


Фиг. 11А

17/104

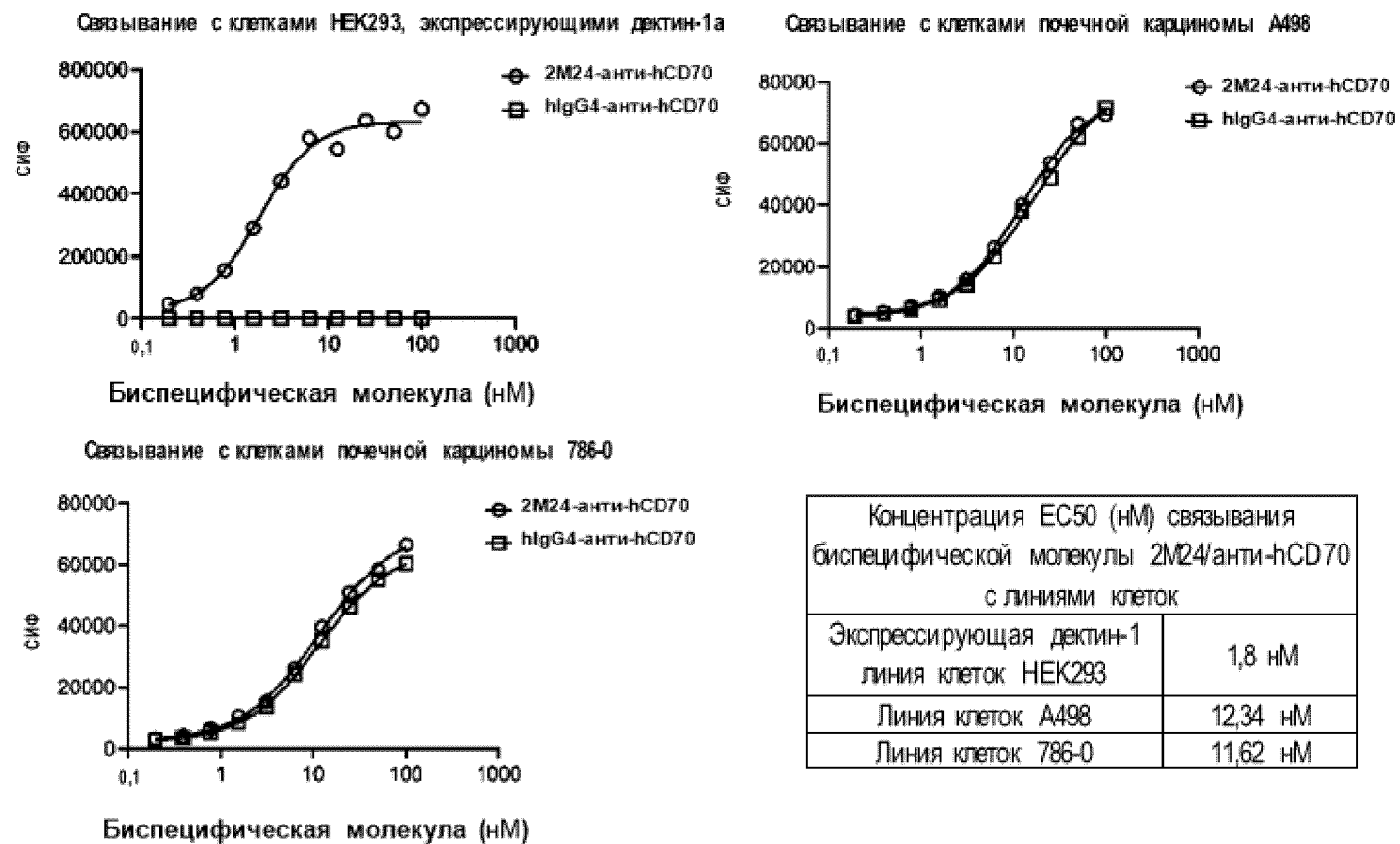
| Мишени для онкологии |
|----------------------|
| CD70 |
| HER2 |
| DLL3 |
| NECTIN-4 |
| TROP-2 |
| МЕЗОТЕЛИН |
| LIV-1 |
| C-MET |
| FOLR1 |
| EGFR |

Фиг. 11В



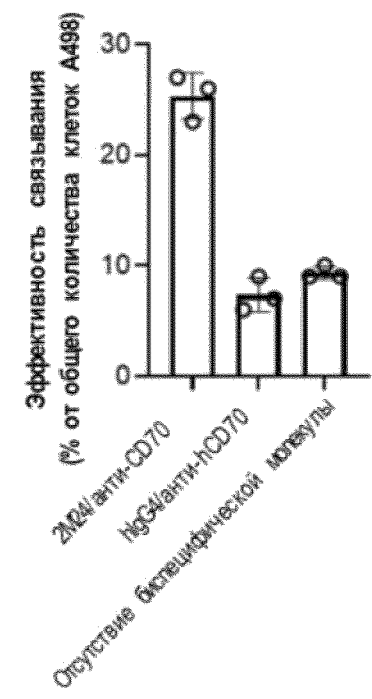
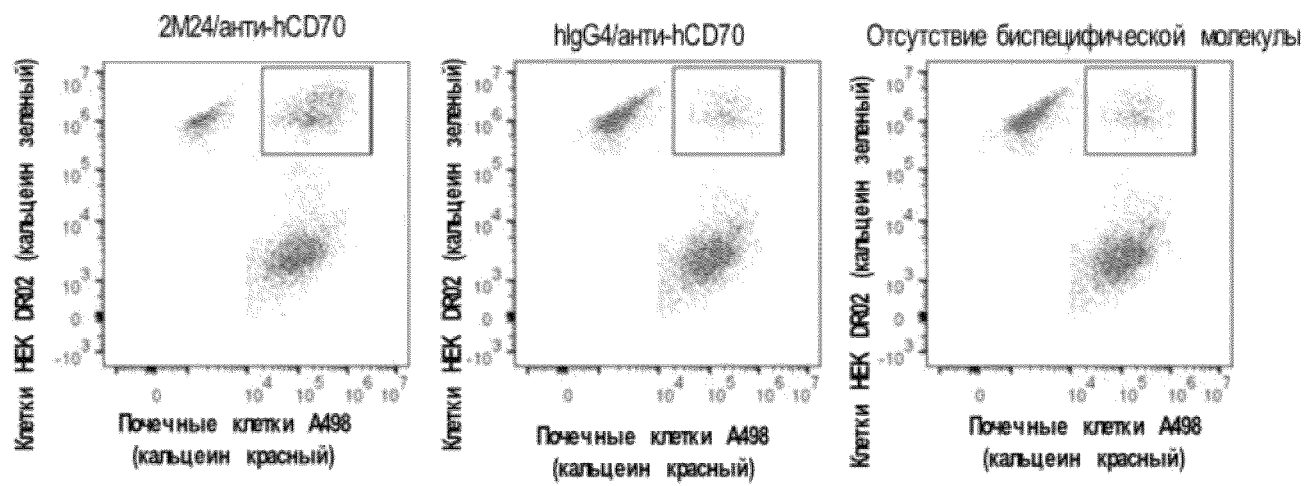
18/104

Фиг. 12А



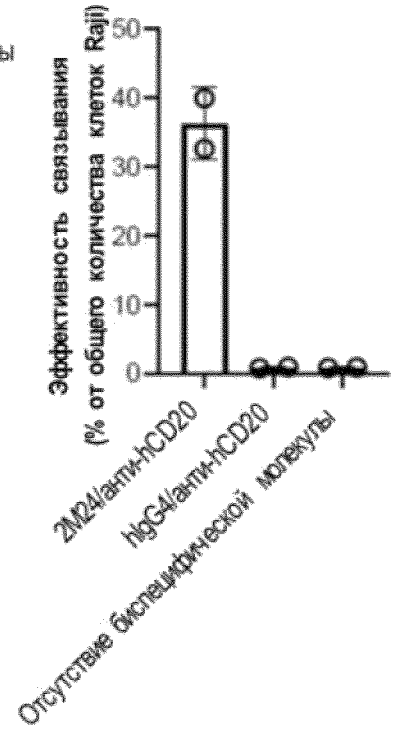
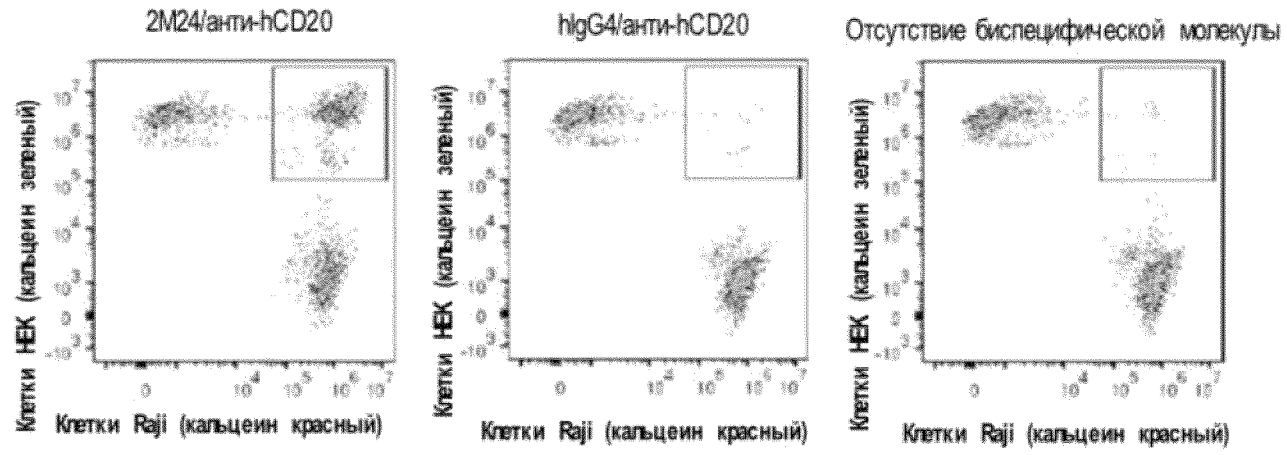
19/104

Фиг. 12В



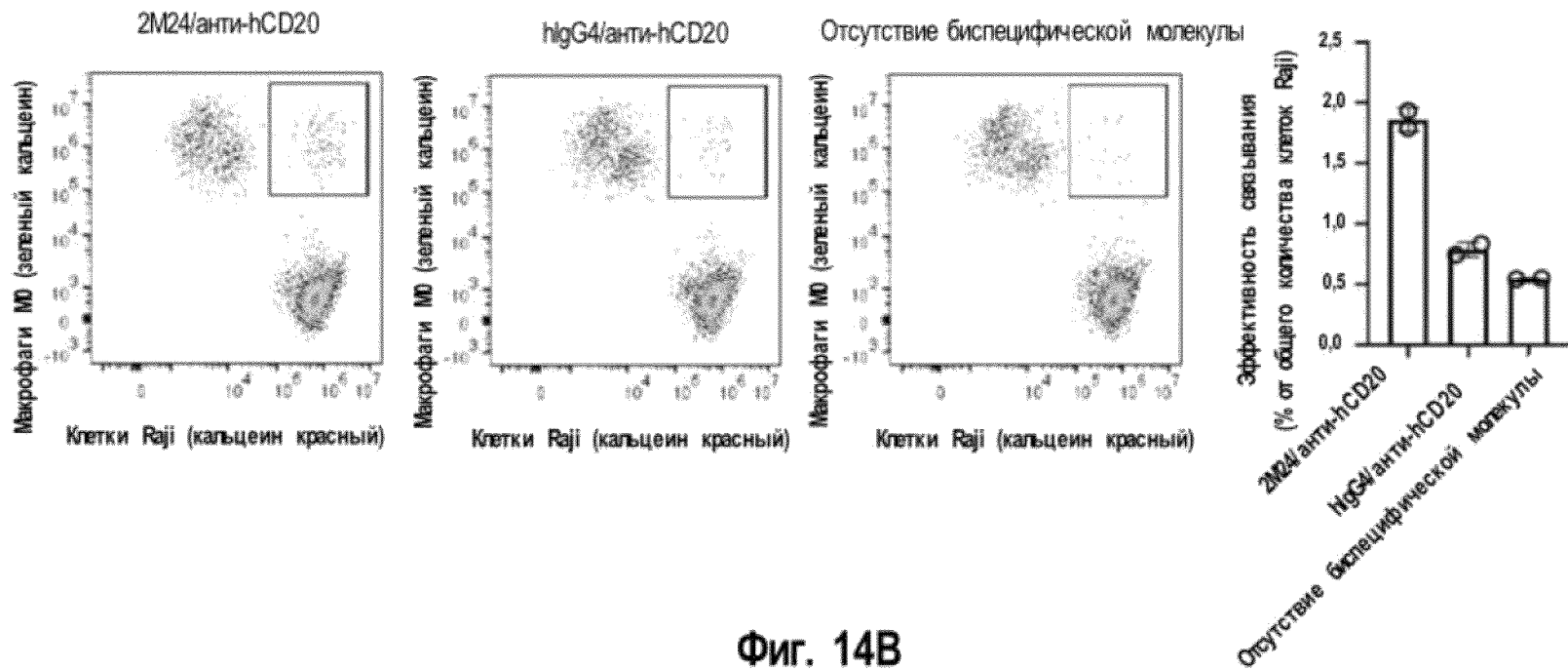
Фиг. 13

Связывание клеток HEK293, экспрессирующих дектин-1, и клеток Raji



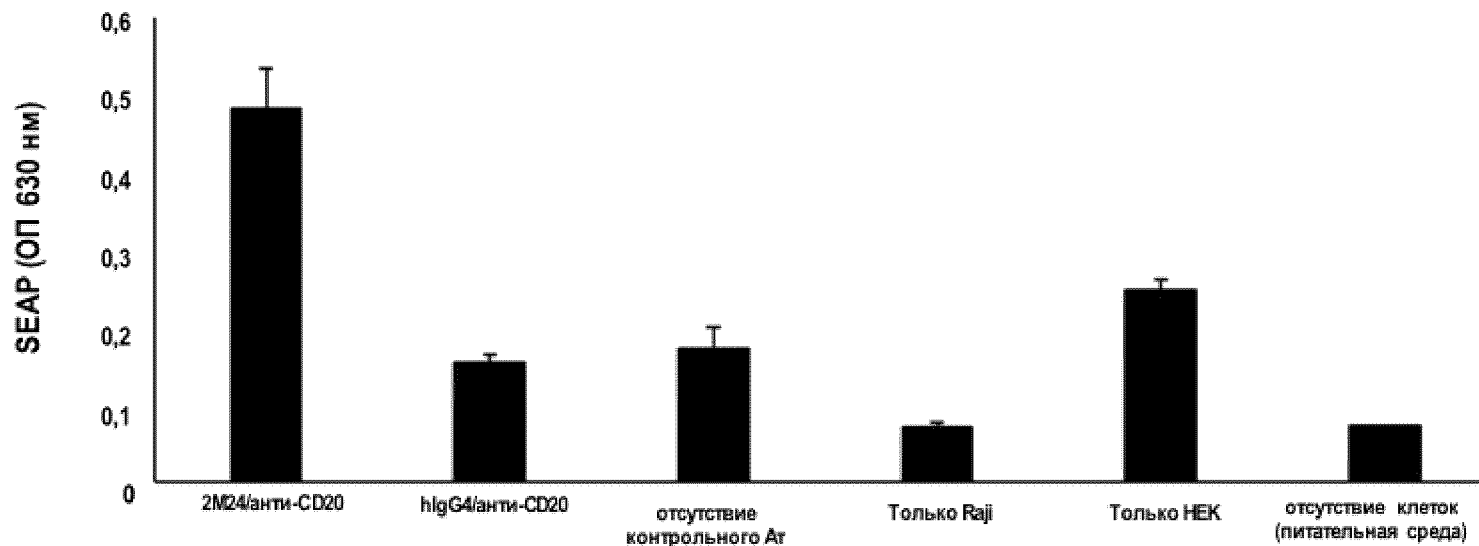
Фиг. 14А

Связывание макрофагов M0 человека и клеток Raji



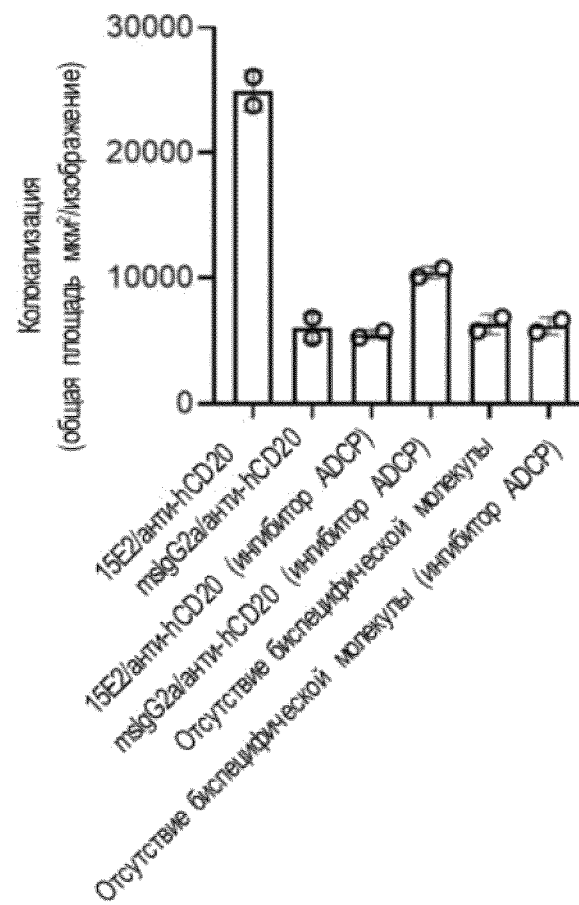
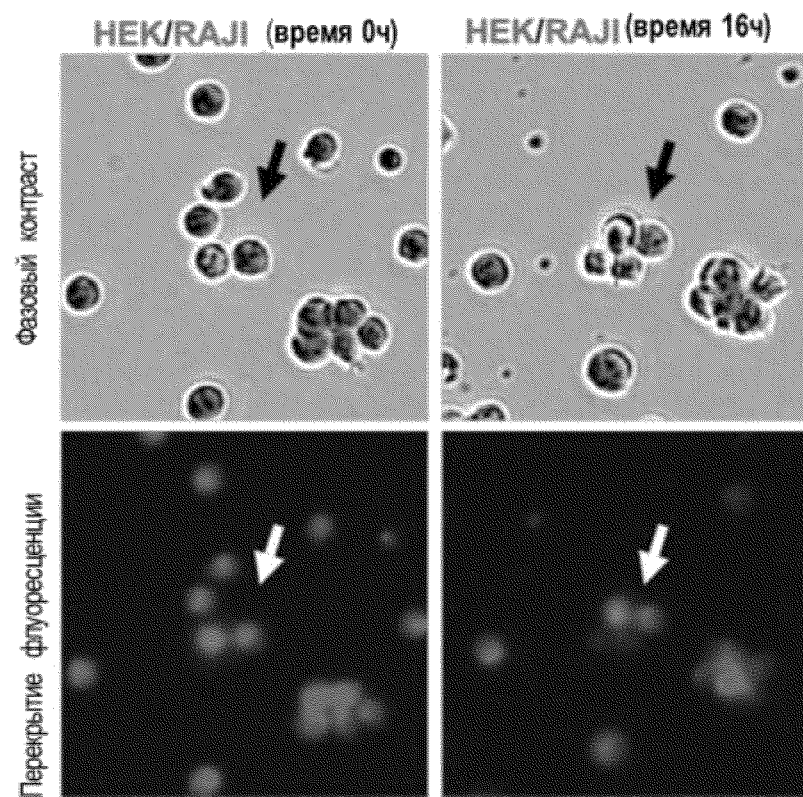
Фиг. 14В

Секреция щелочной фосфатазы с помощью биспецифической молекулы дектин-1/анти-CD20 в присутствии клеток Raji в клетках HEK-Blue hDectin-1a

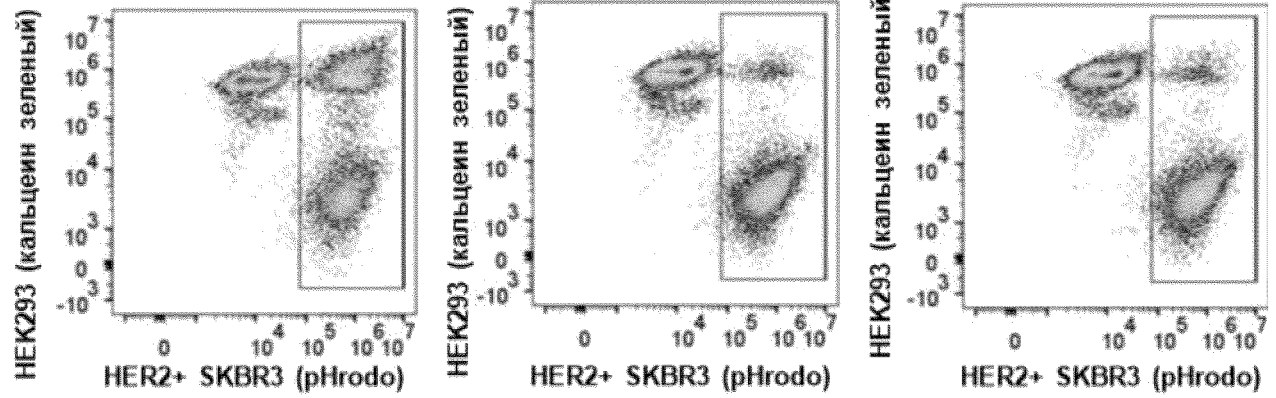


Фиг. 15

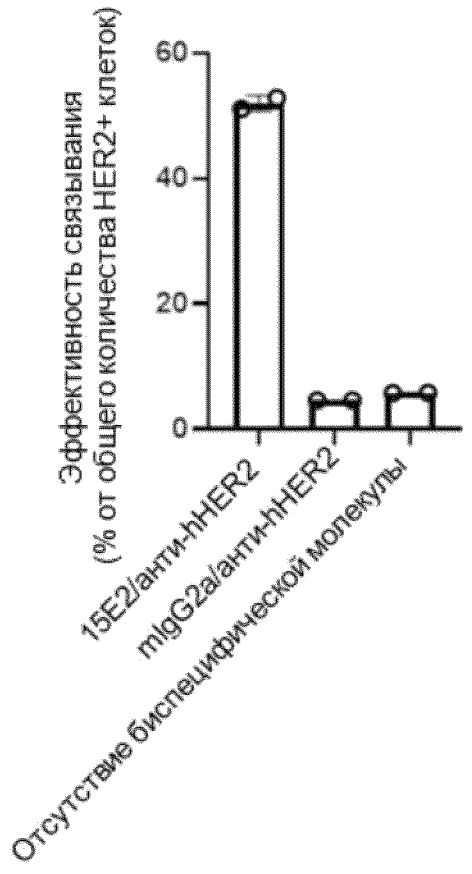
Лечение биспецифической молекулой 15E2/анти-hCD20

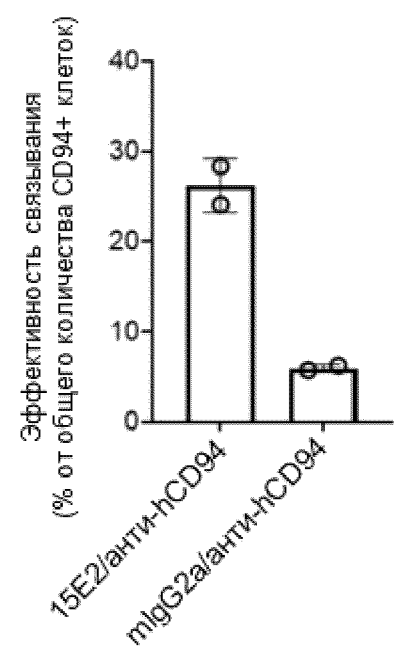
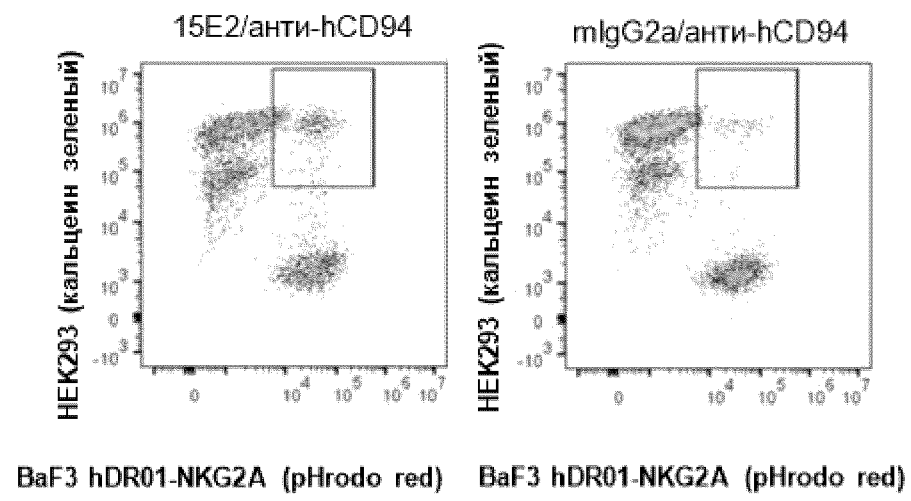


Фиг. 16



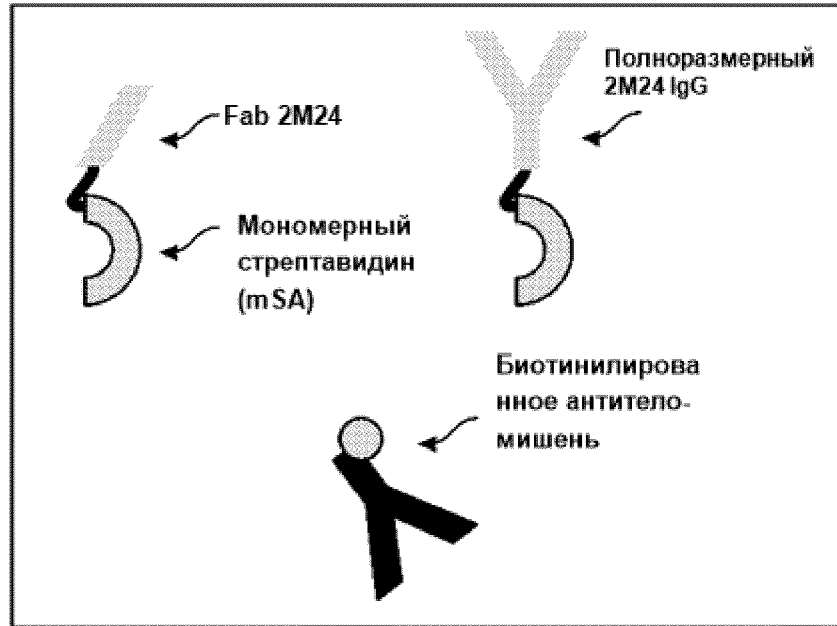
Фиг. 17





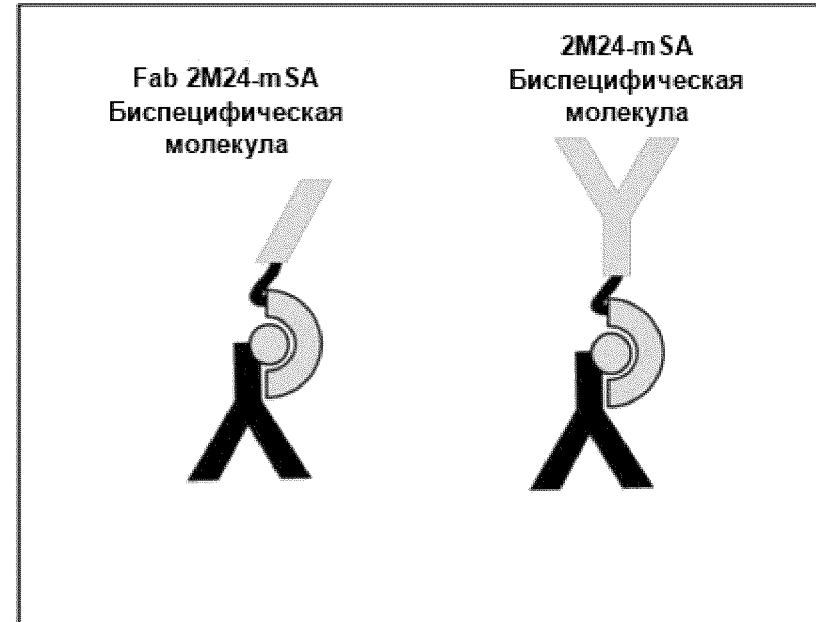
Фиг. 18

Химерные белки мономерного стрептавидина (mSA) и Fab 2M24 или полноразмерного 2M24

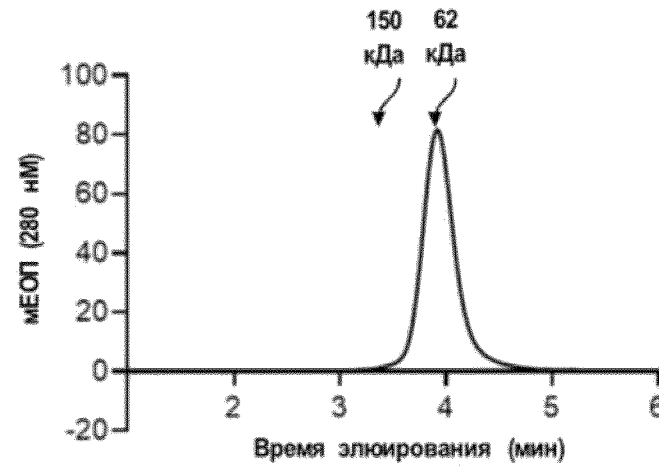


Фиг. 19А

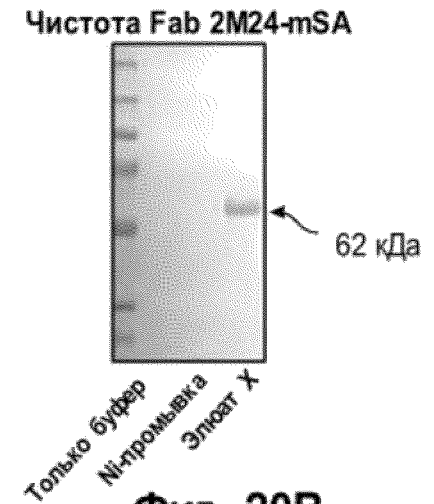
Связывание Fab 2M24-mSA или 2M24-mSA с биотинилированными антителами-мишенями



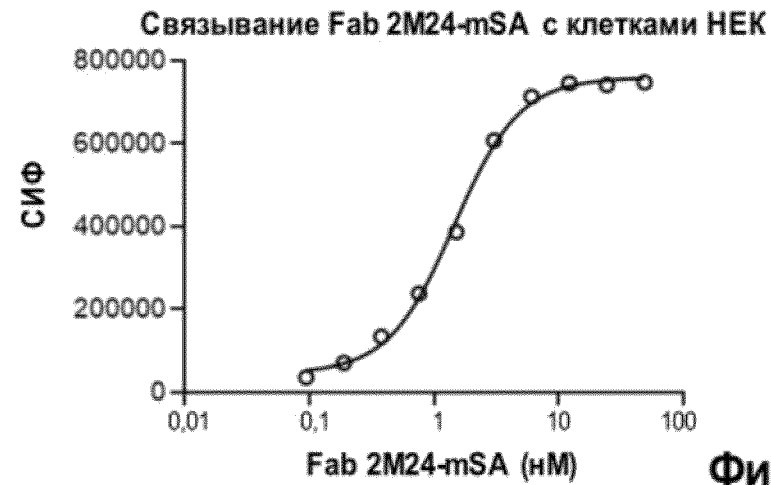
Фиг. 19В



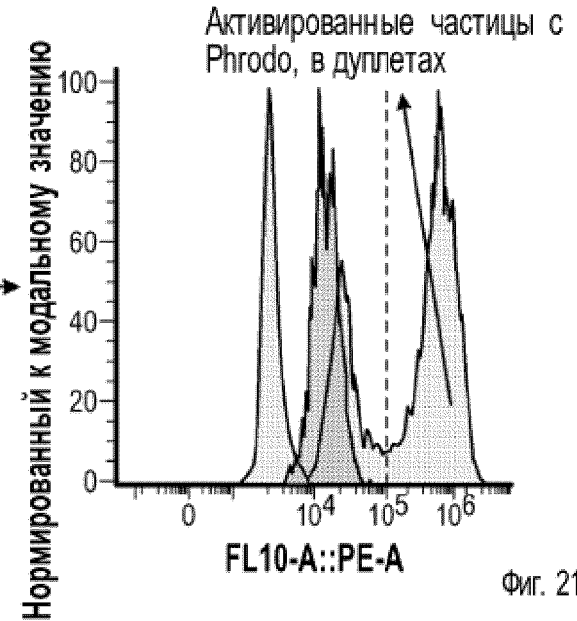
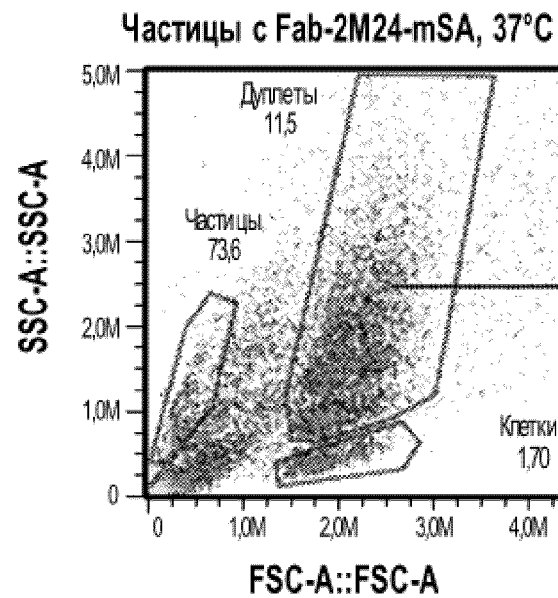
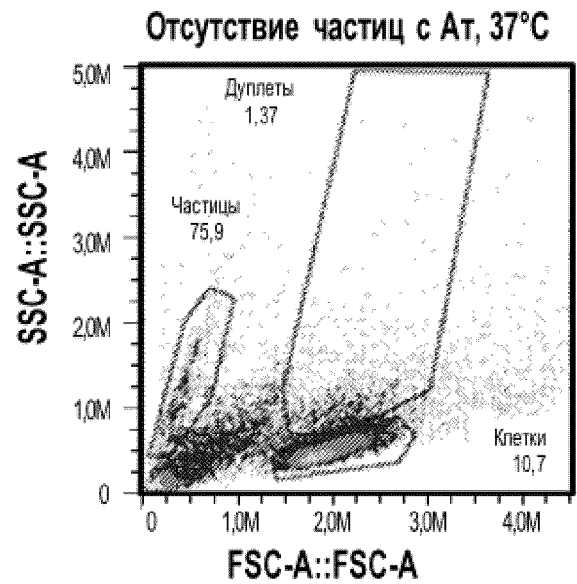
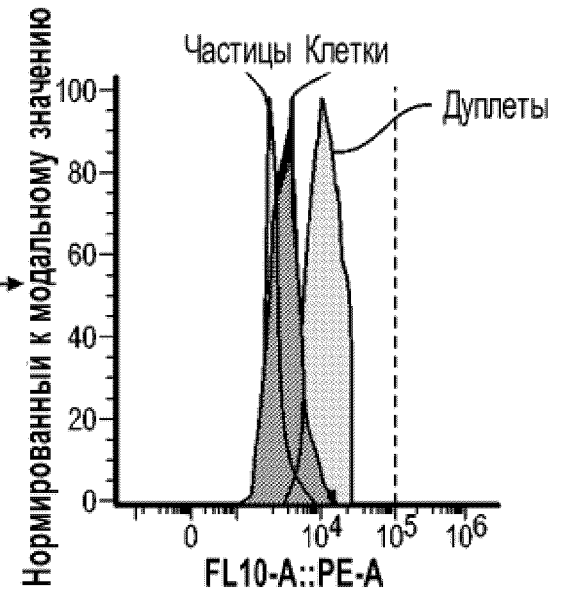
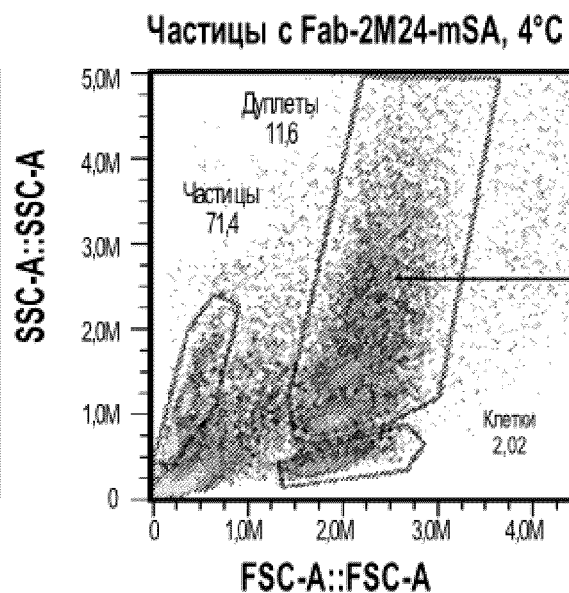
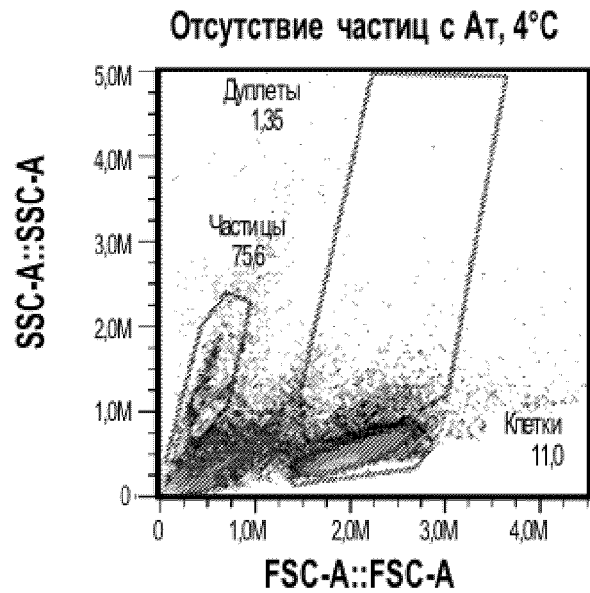
Фиг. 20А



Фиг. 20В



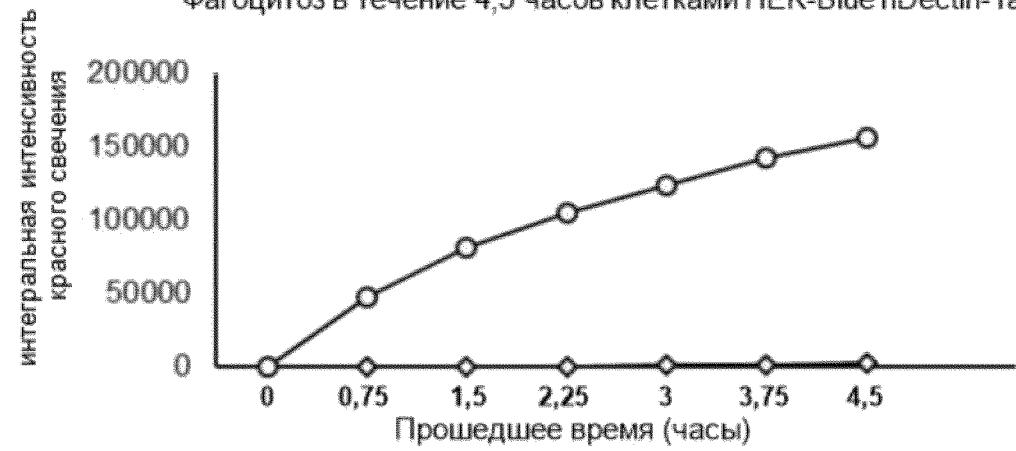
Фиг. 20С



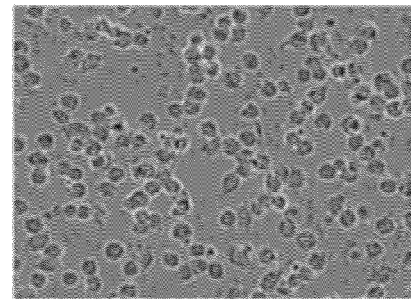
29/104

Фиг. 21А

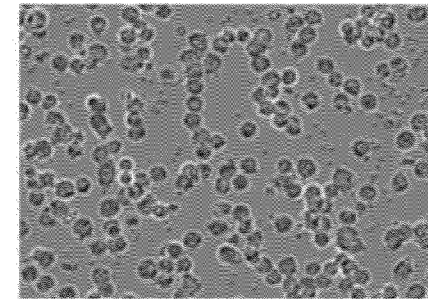
Фагоцитоз в течение 4,5 часов клетками HEK-Blue hDectin-1a



Отсутствие частиц с антителами



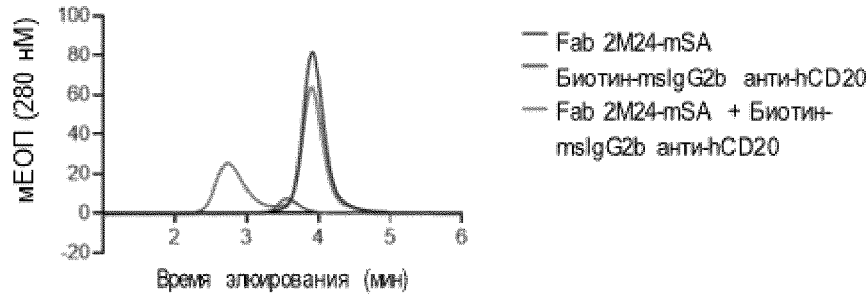
Частицы с Fab-2M24-mSA



30/104

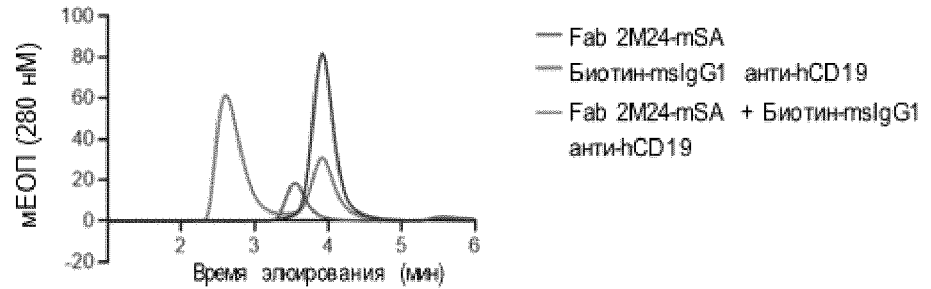
Фиг. 21В

Fab 2M24-mSA + Биотин-mslgG2b анти-hCD20



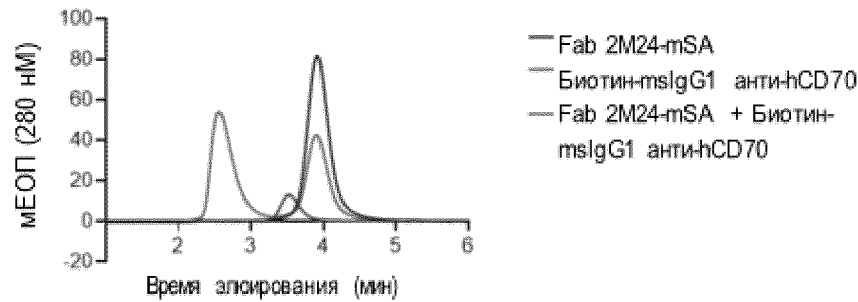
Фиг. 22А

Fab 2M24-mSA + Биотин-mslgG1 анти-hCD19



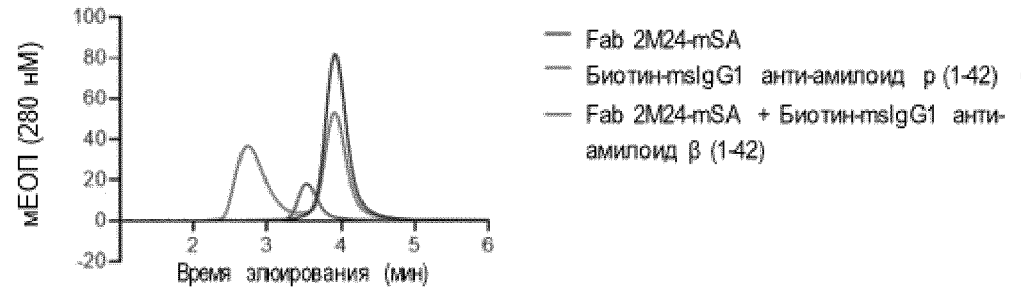
Фиг. 22В

Fab 2M24 mSA + Биотин-mslgG1 анти-hCD70

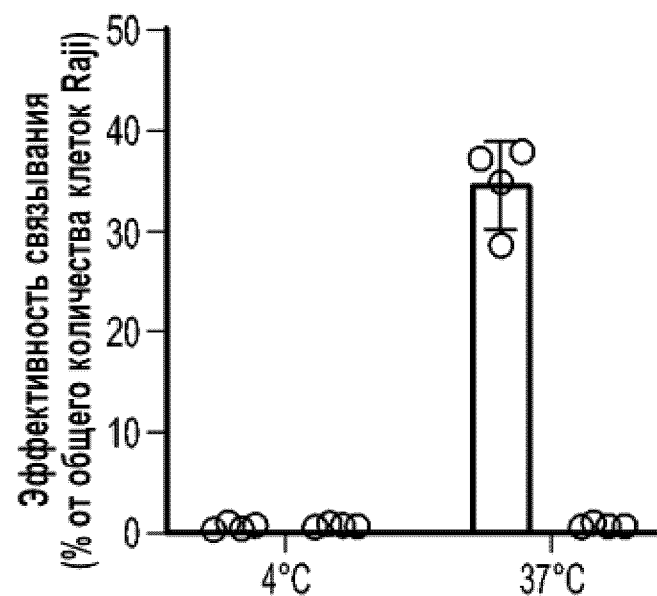
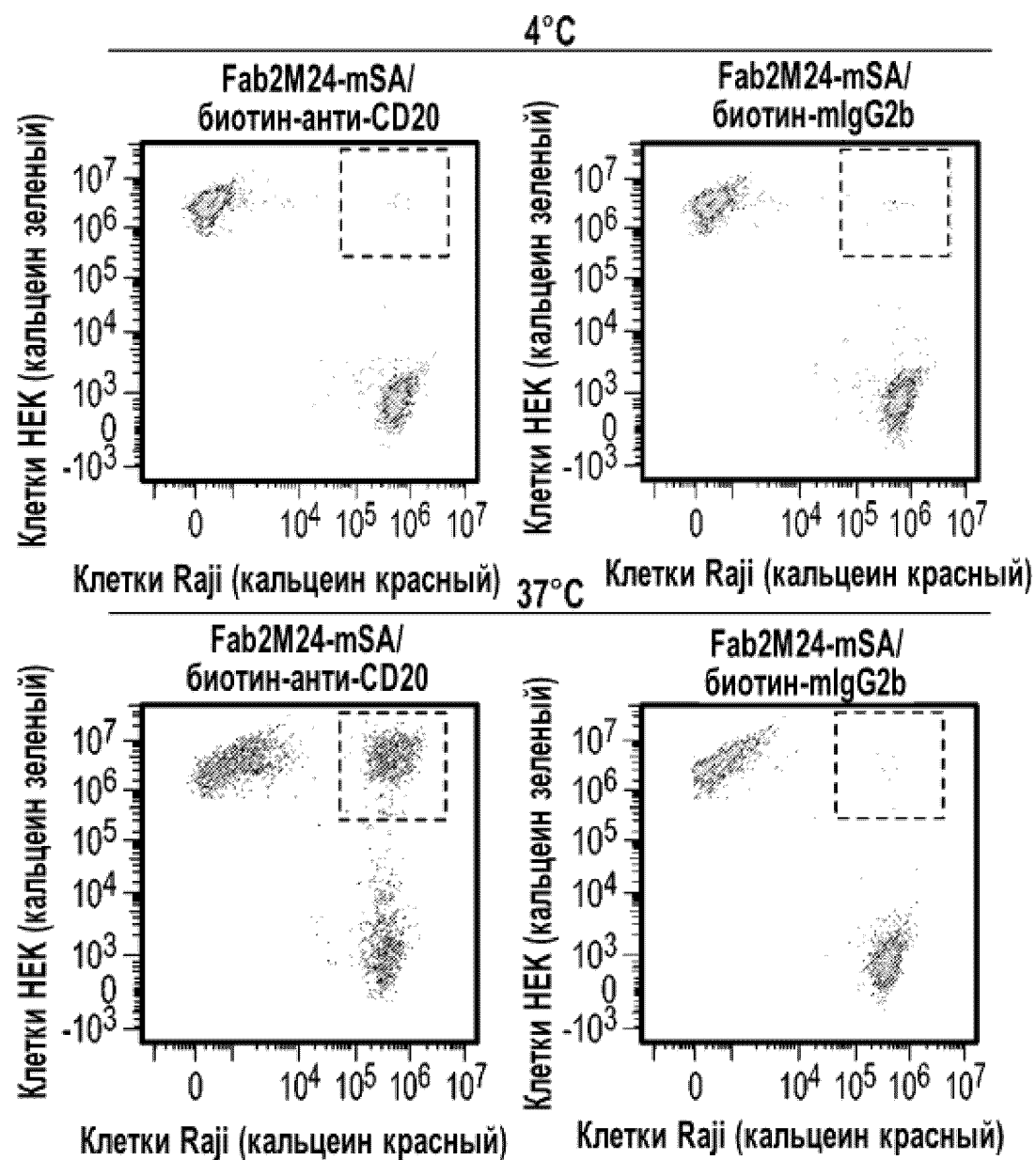


Фиг. 22С

Fab 2M24-mSA + Биотин-mslgG1 анти-амилоид β (1-42)



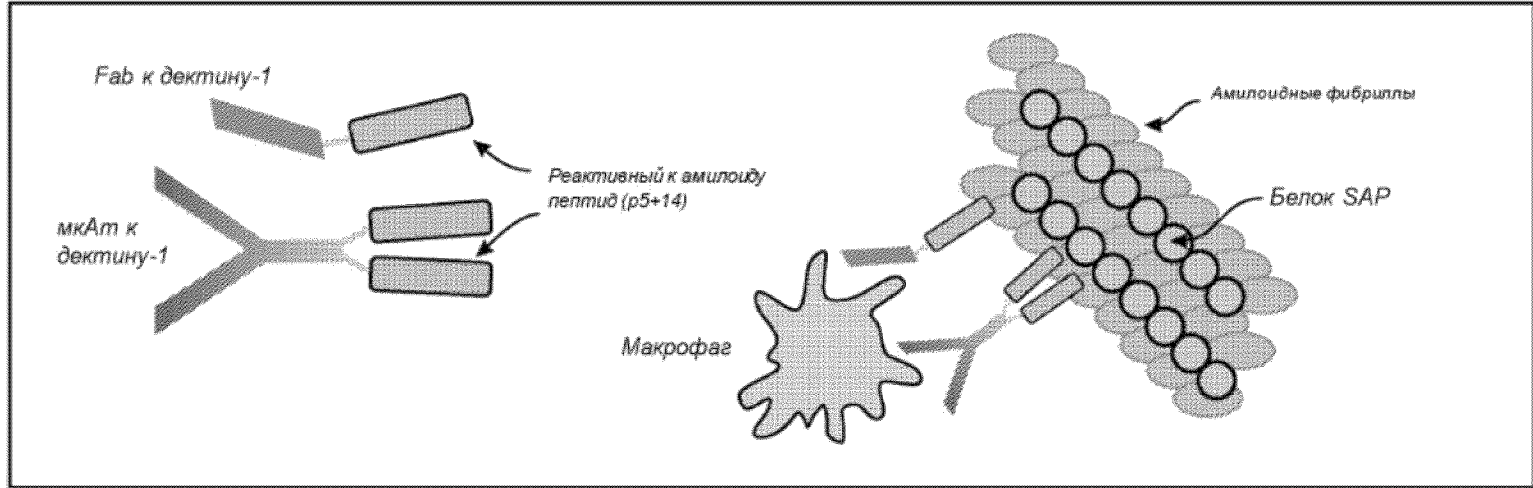
Фиг. 22D



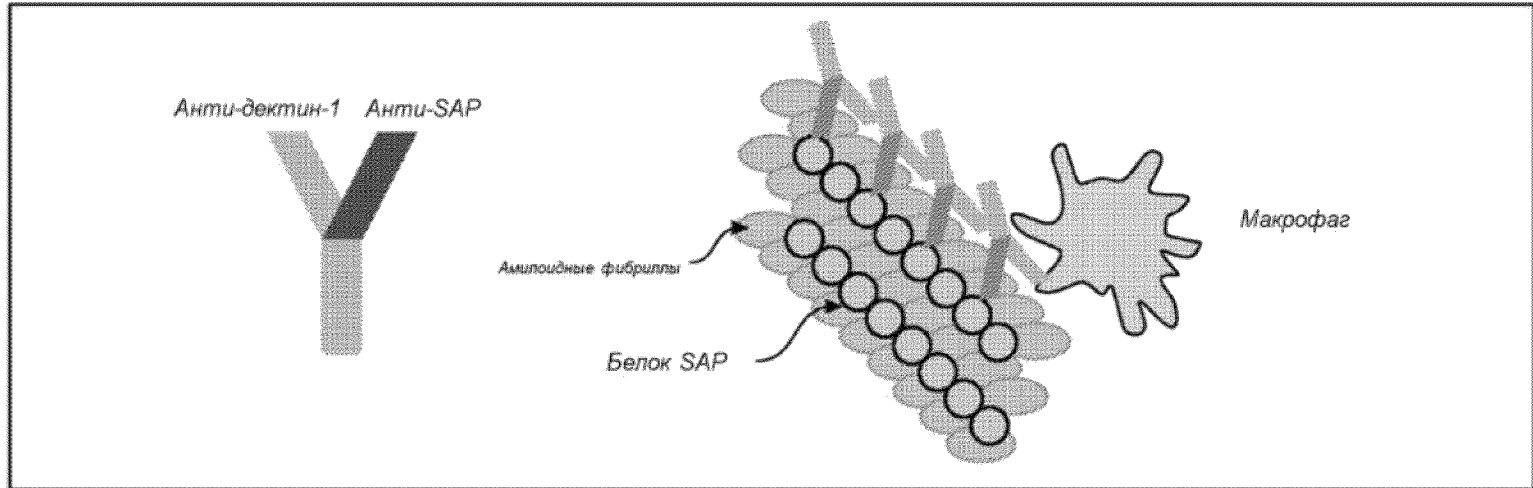
32/104

Фиг. 23

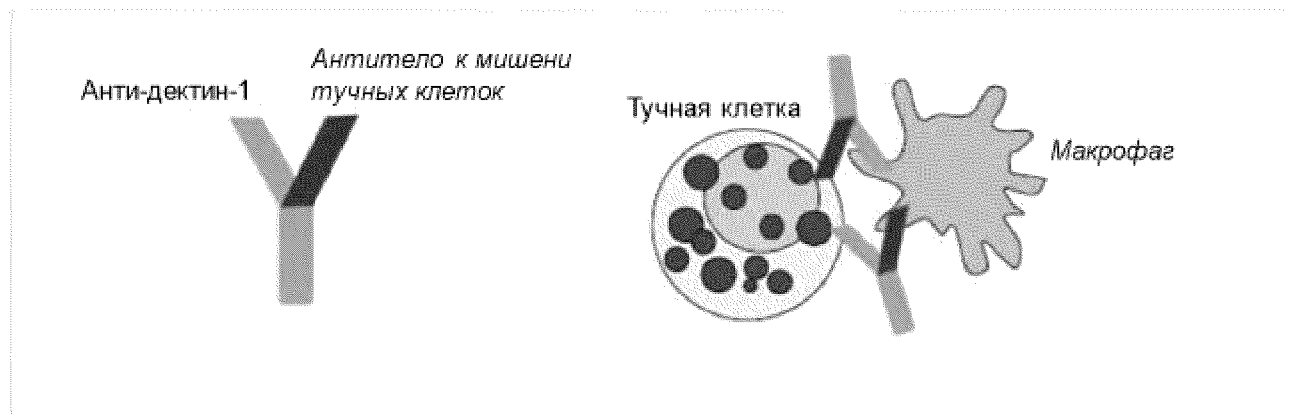
Химерное антитело к дектину-1 (или Fab), слитое с реактивным к амилоиду пептидом (p5+14), для направленного фагоцитоза амилоидных фибрилл



Биспецифическое антитело, которое связывается с дектином-1 и сывороточным амилоидным белком Р (SAP) для целенаправленного фагоцитоза амилоидных фибрилл



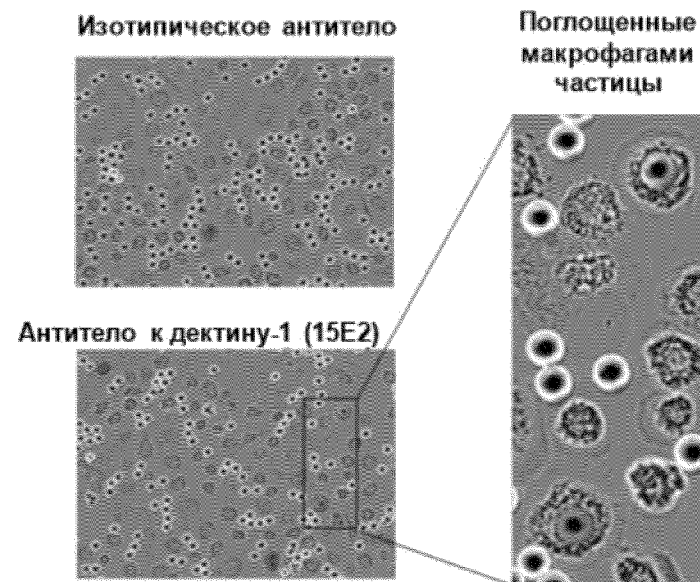
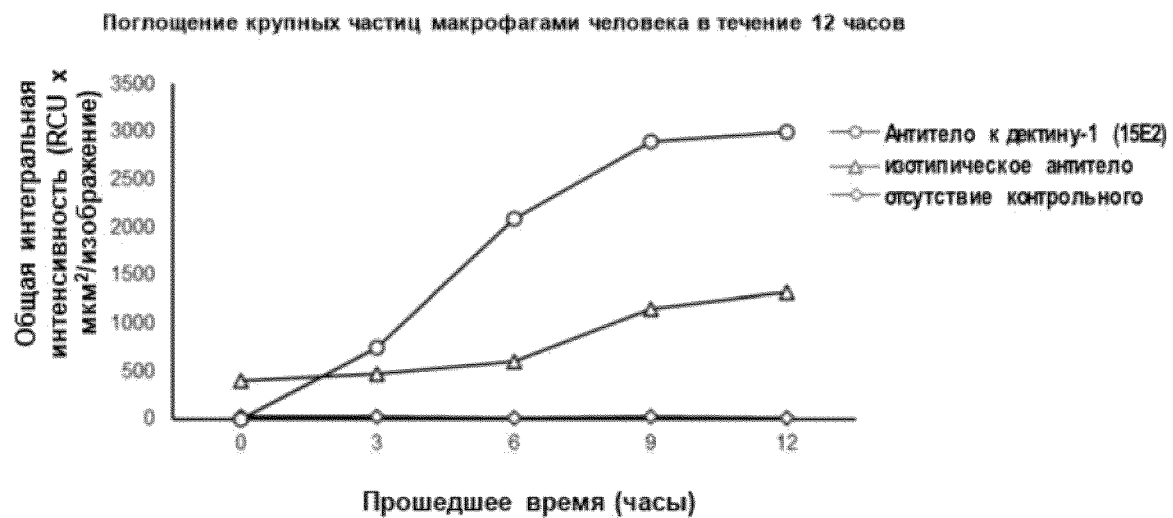
Фиг. 24



Фиг. 25А

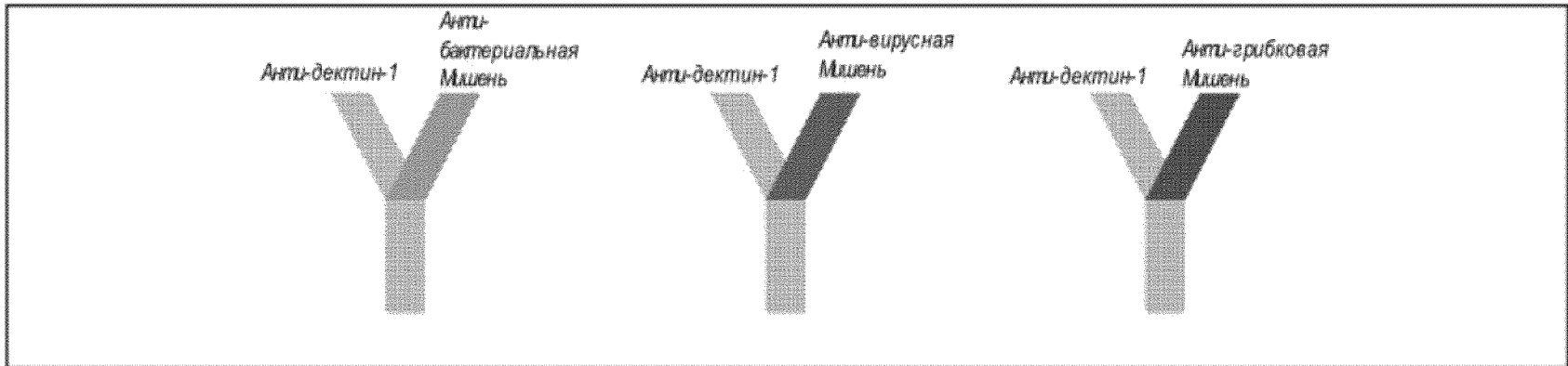
| <i>Мишени, определенные протеомными исследованиями</i> | <i>Мишени, идентифицированные путем секвенирования РНК образцов пациентов с мастоцитозом</i> |
|--|--|
| MRGPRX2 | CD33 (SIGLEC 3) |
| CD171 (L1CAM) | CD25 (L25Ra) |
| SIGLEC 6 | CD30 (TNFRFS8) |
| CD117 | SIGLEC 8 |
| CD203c | CD13 |
| CD51 | CD44 |
| DPP4 | CD52 |
| | CD117 |
| | CD 123 |

Фиг. 25В

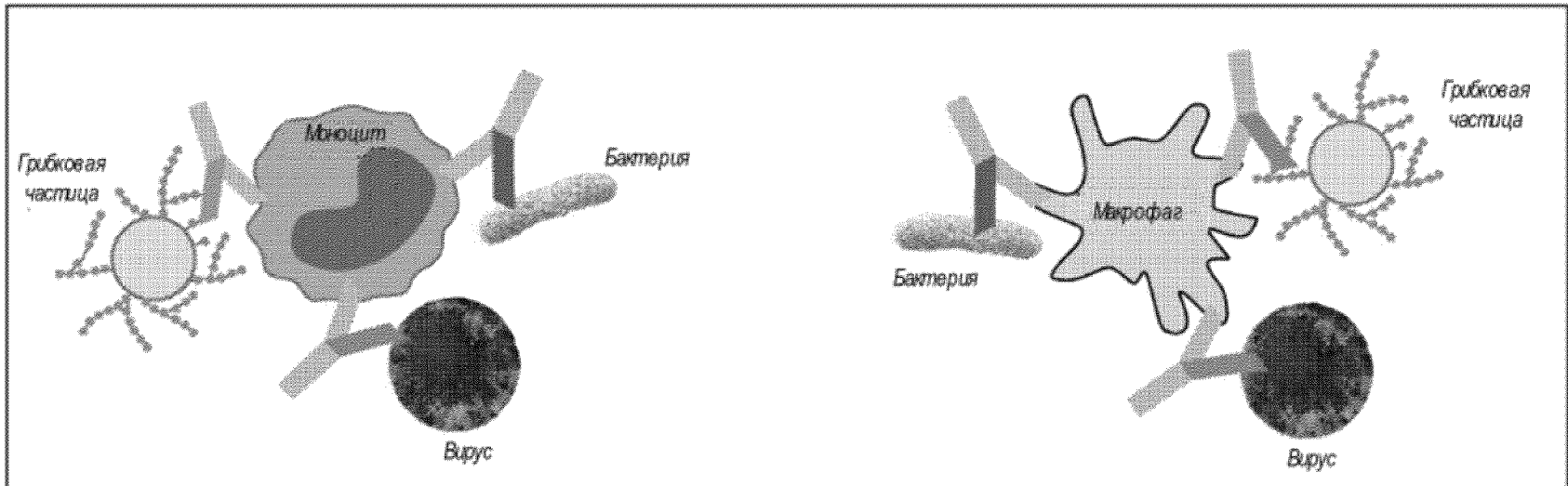


Фиг. 26

Биспецифическая молекула (анти-Дектин-1/анти-микробная мишень) против бактерий, вирусов и грибов

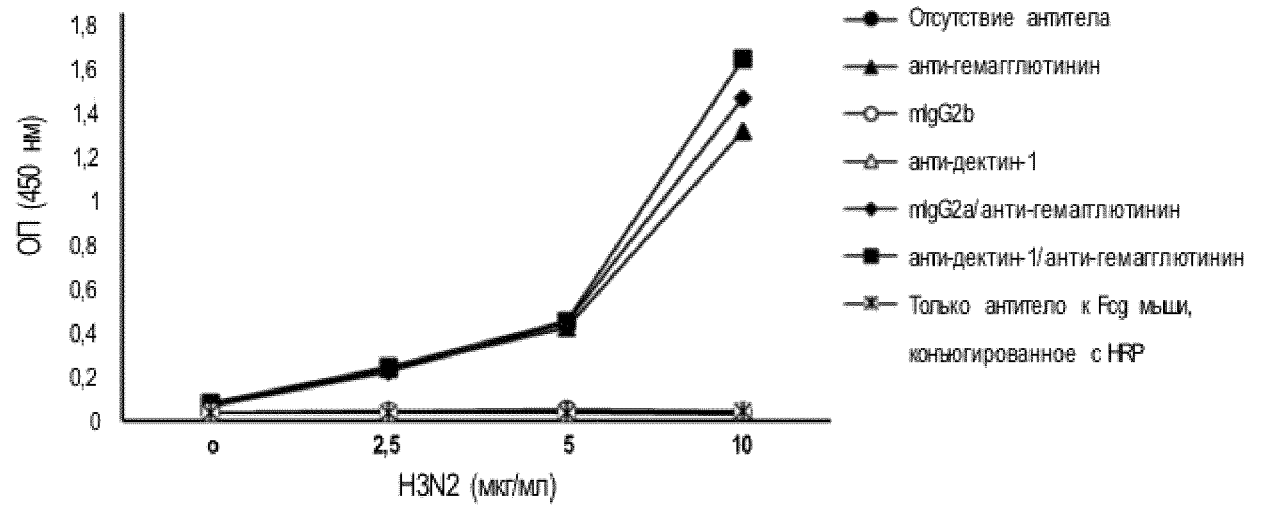


Биспецифические антитела к Дектин-1 направляют фагоциты, экспрессирующие дектин-1, на уничтожение бактериальных, вирусных или грибковых патогенов



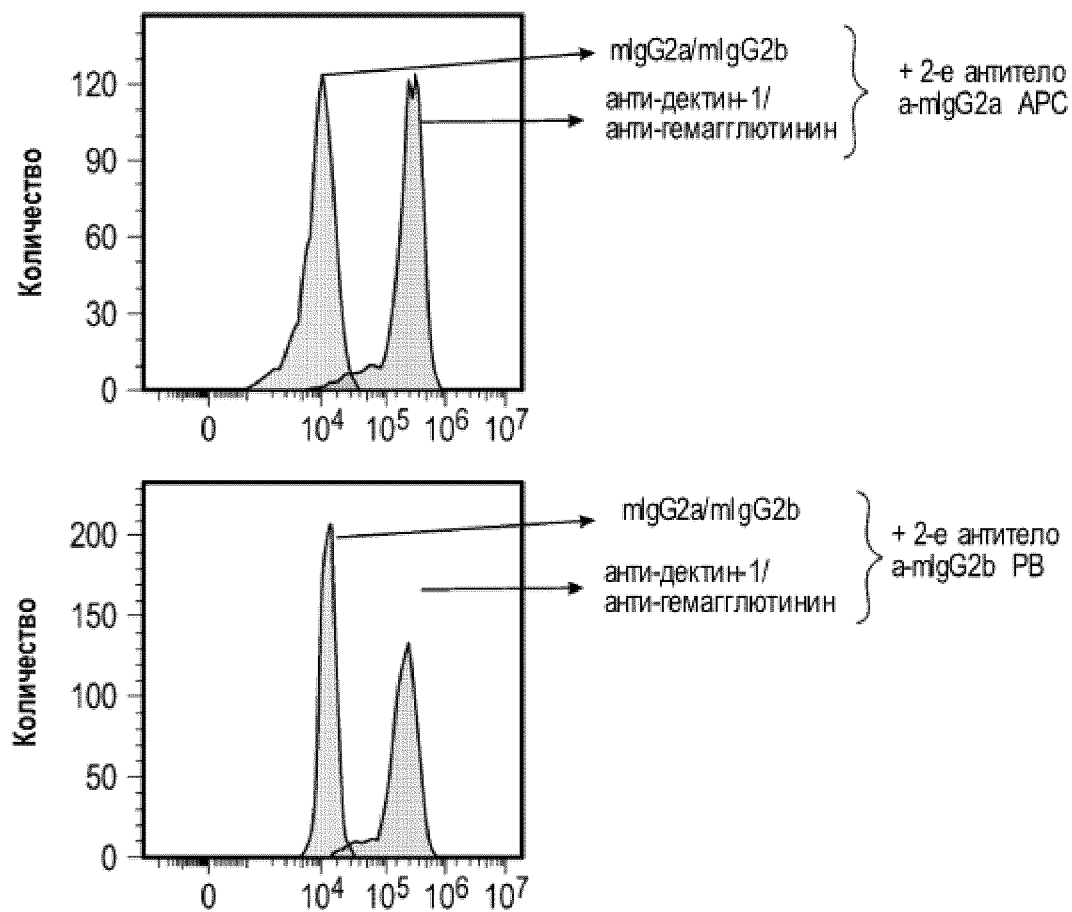
Фиг. 27

Связывание биспецифической молекулы анти-дектин-1/анти-гемагглютинин с вирусом гриппа H3N2

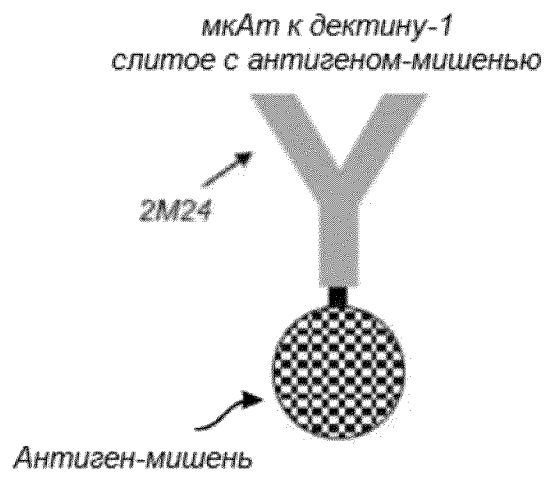


Фиг. 28А

Связывание биспецифической молекулы анти-дектин-1/анти-гемагглютинин с клетками HEK-Blue hDectin-1a



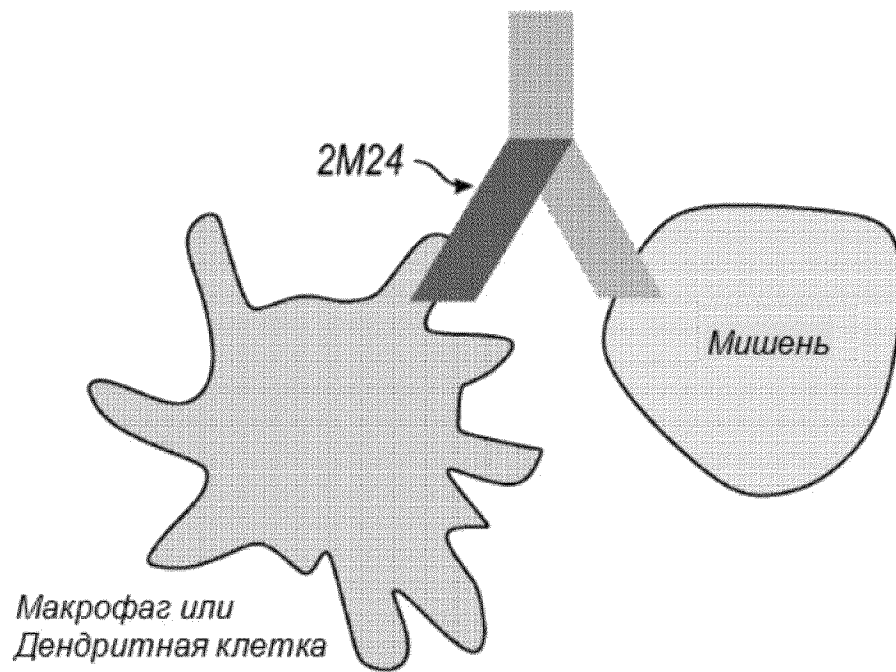
Фиг. 28В



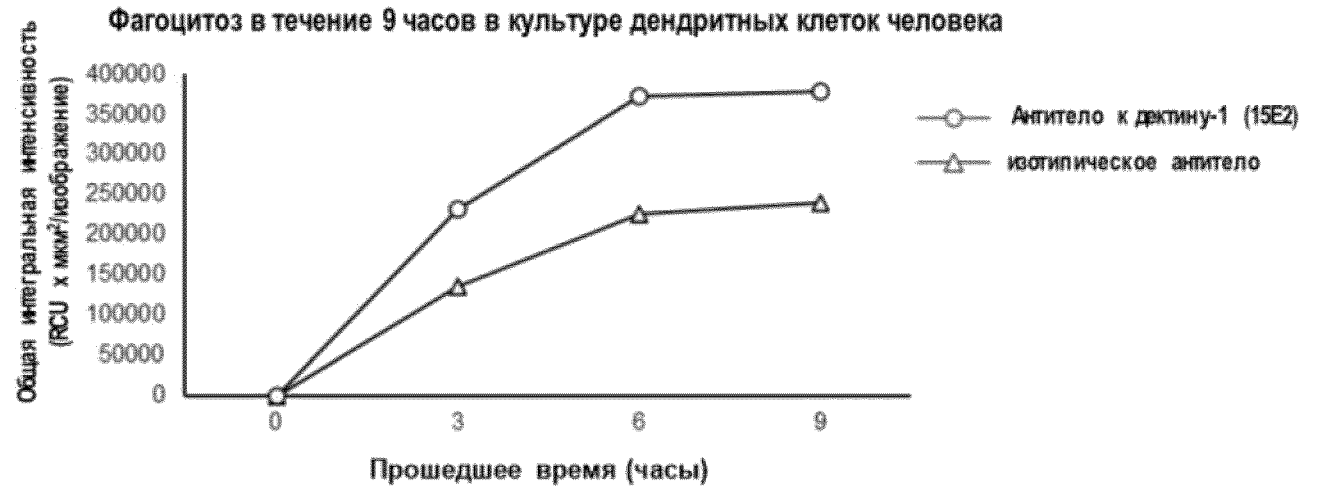
Фиг. 29А

40/104

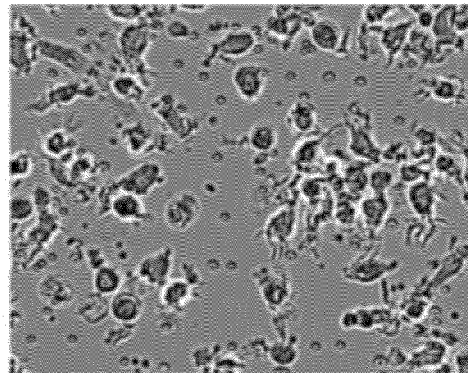
Биспецифическая молекула анти-дектин-1/анти-Мишень



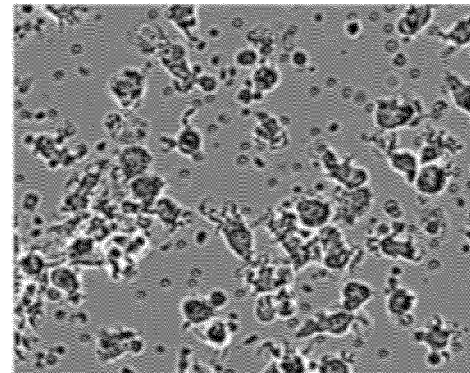
Фиг. 29В



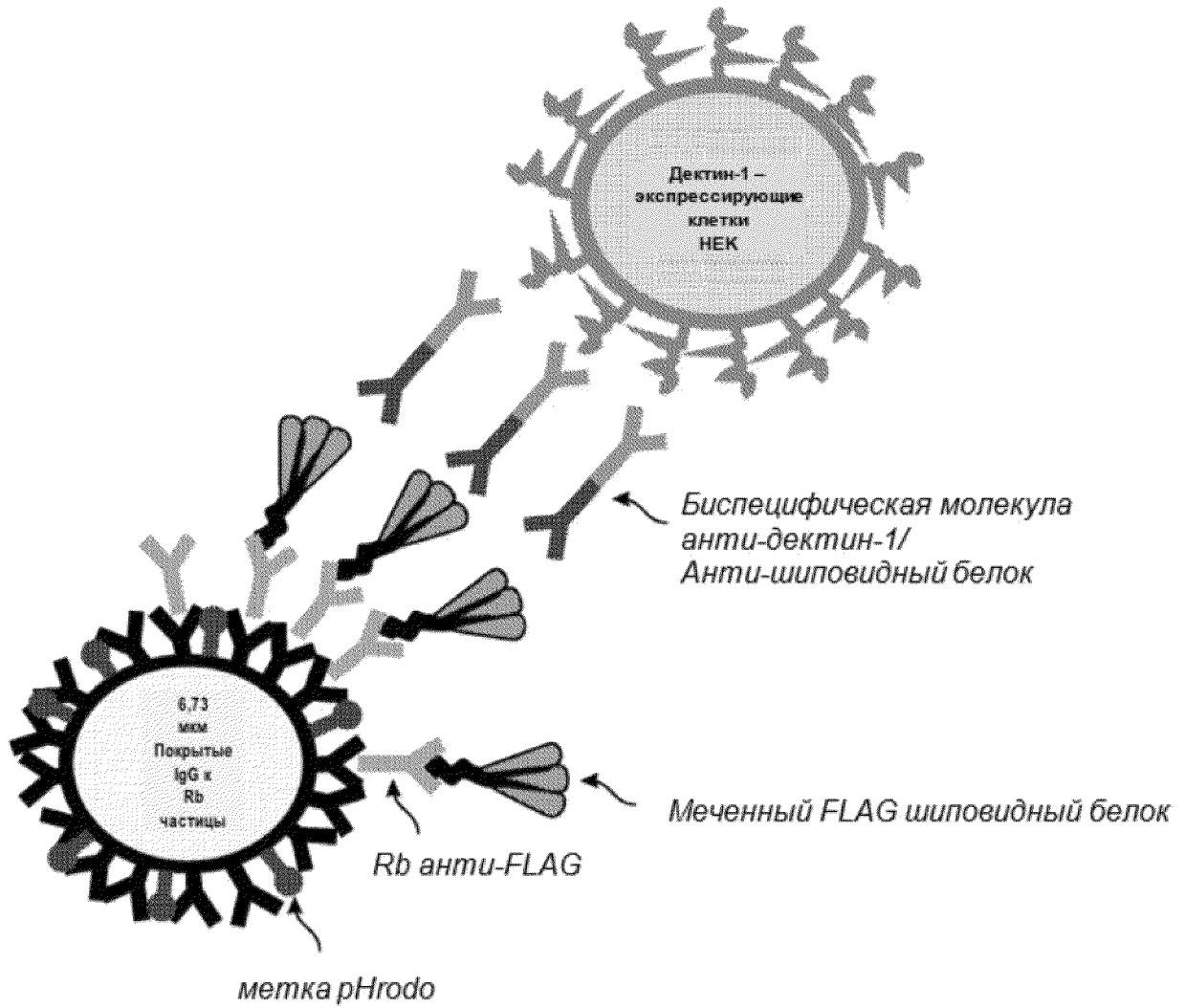
Изотипическое антитело



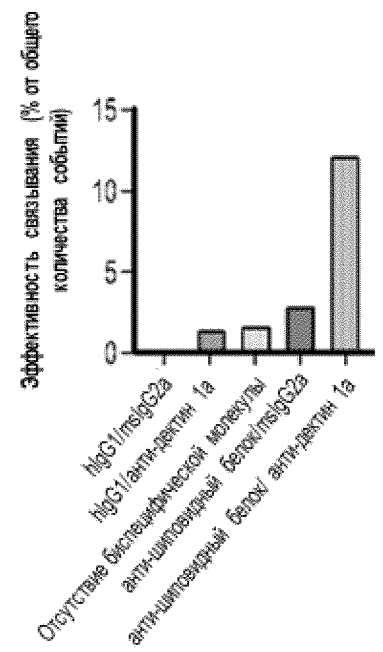
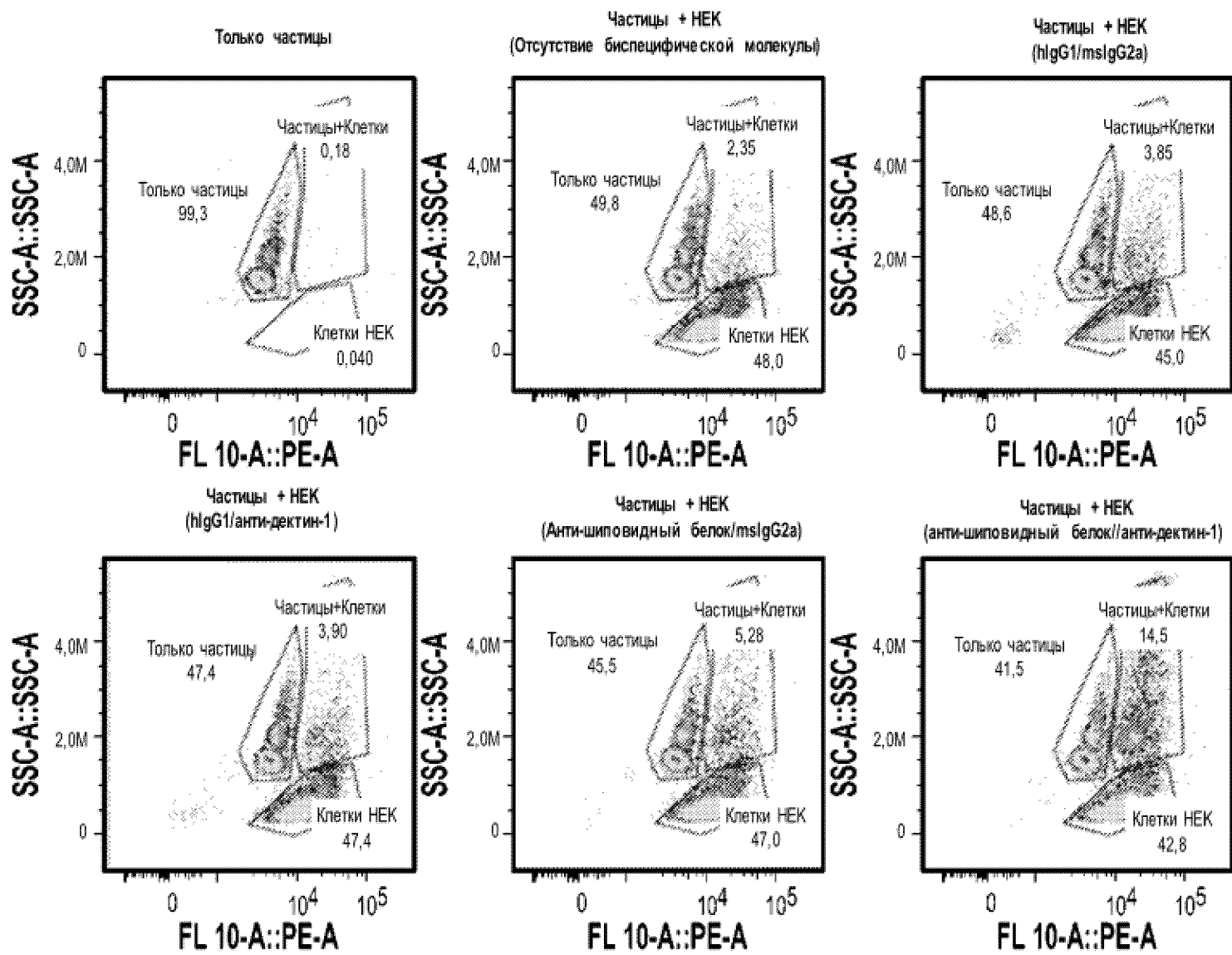
Антитело к дектину-1 (15E2)



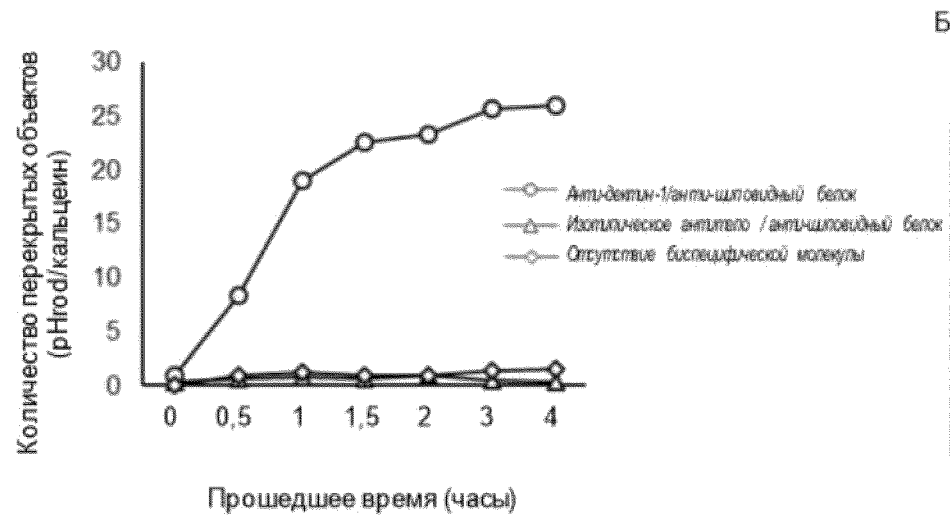
Фиг. 30



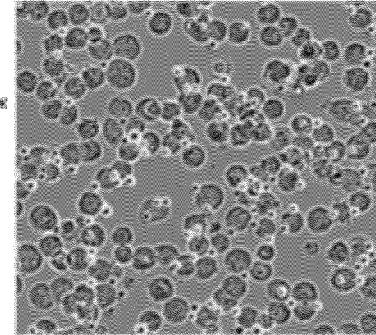
Фиг. 31А



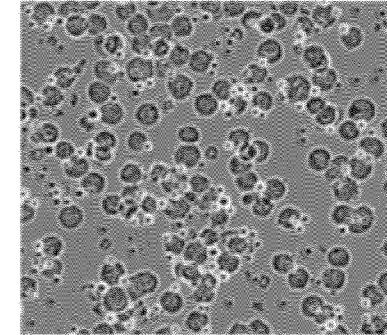
Фиг. 31В



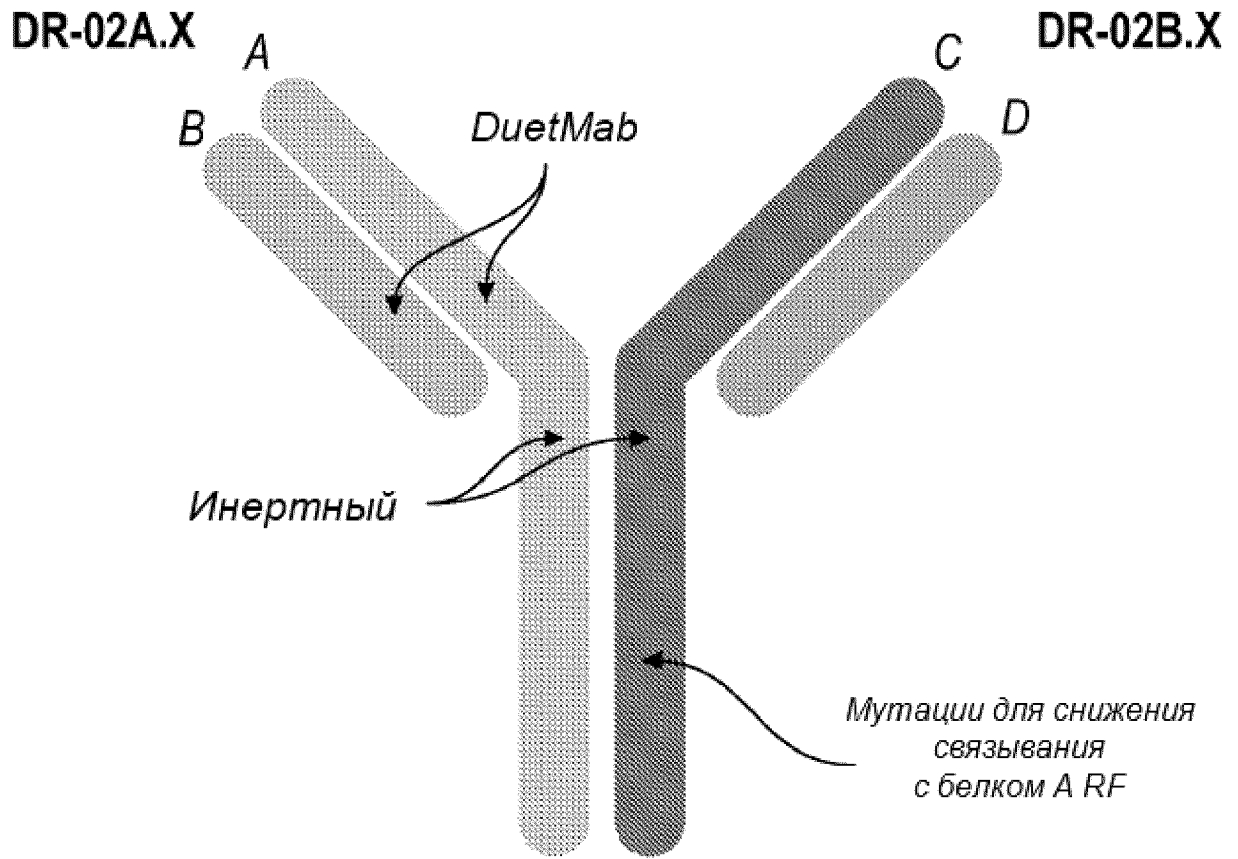
Биспецифическая молекула анти-декстрин-1 (15E2)/ Анти-шиповидный белок



изо тип mIgG2a/ Анти-шиповидный белок

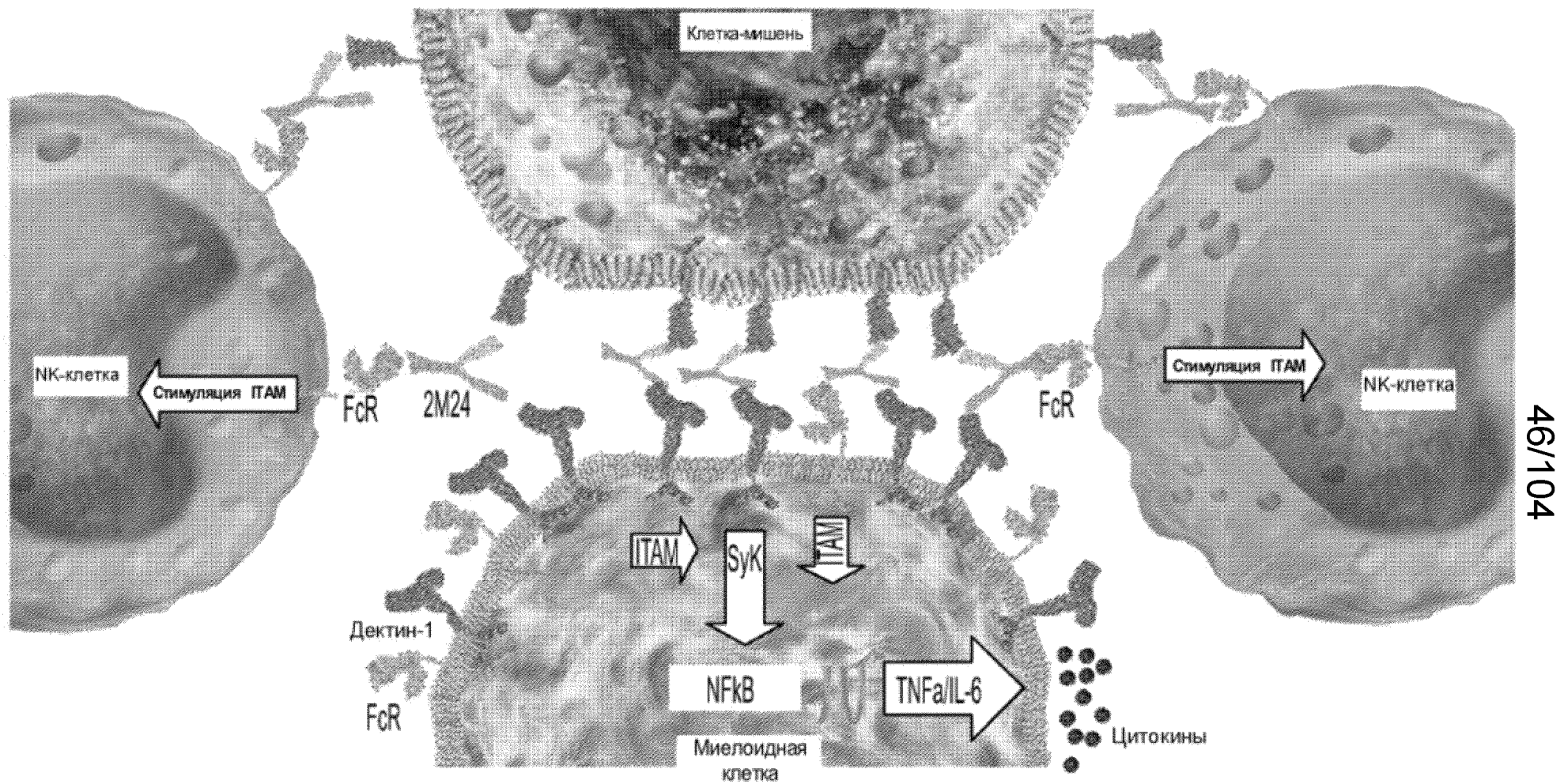


Фиг. 31С



«Выступ» «Впадина»

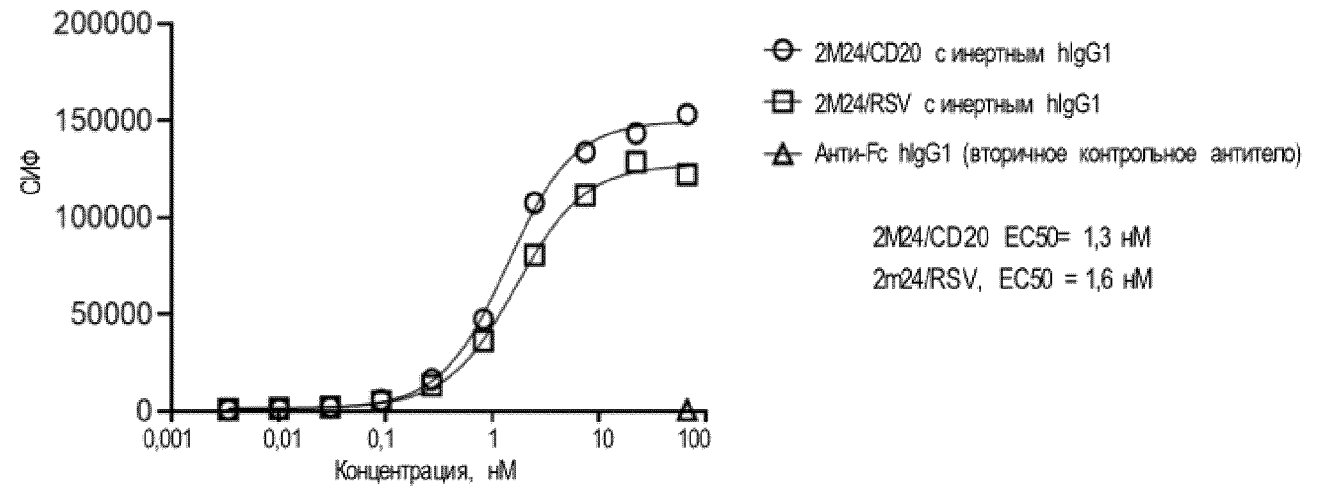
Фиг. 32А



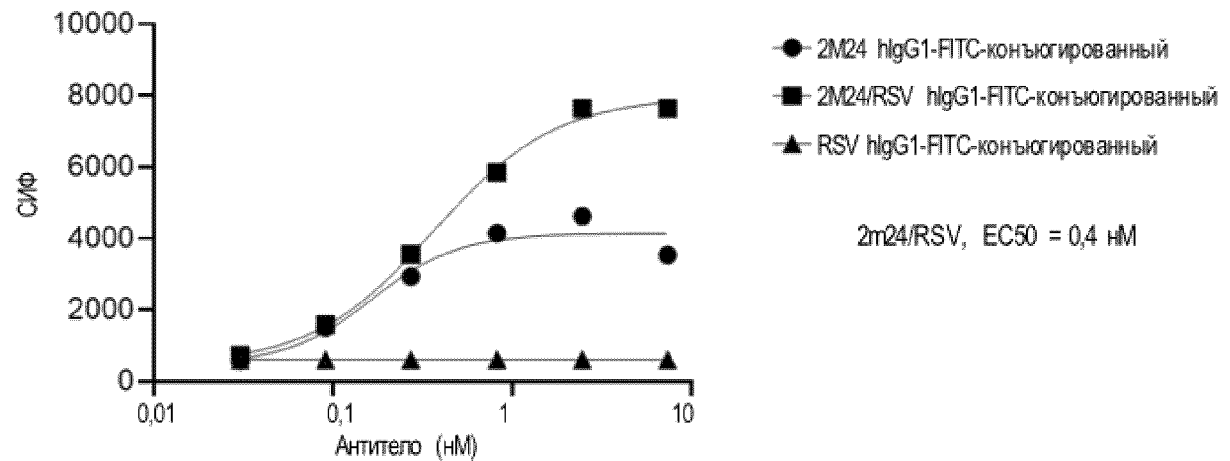
46/104

Фиг. 32В

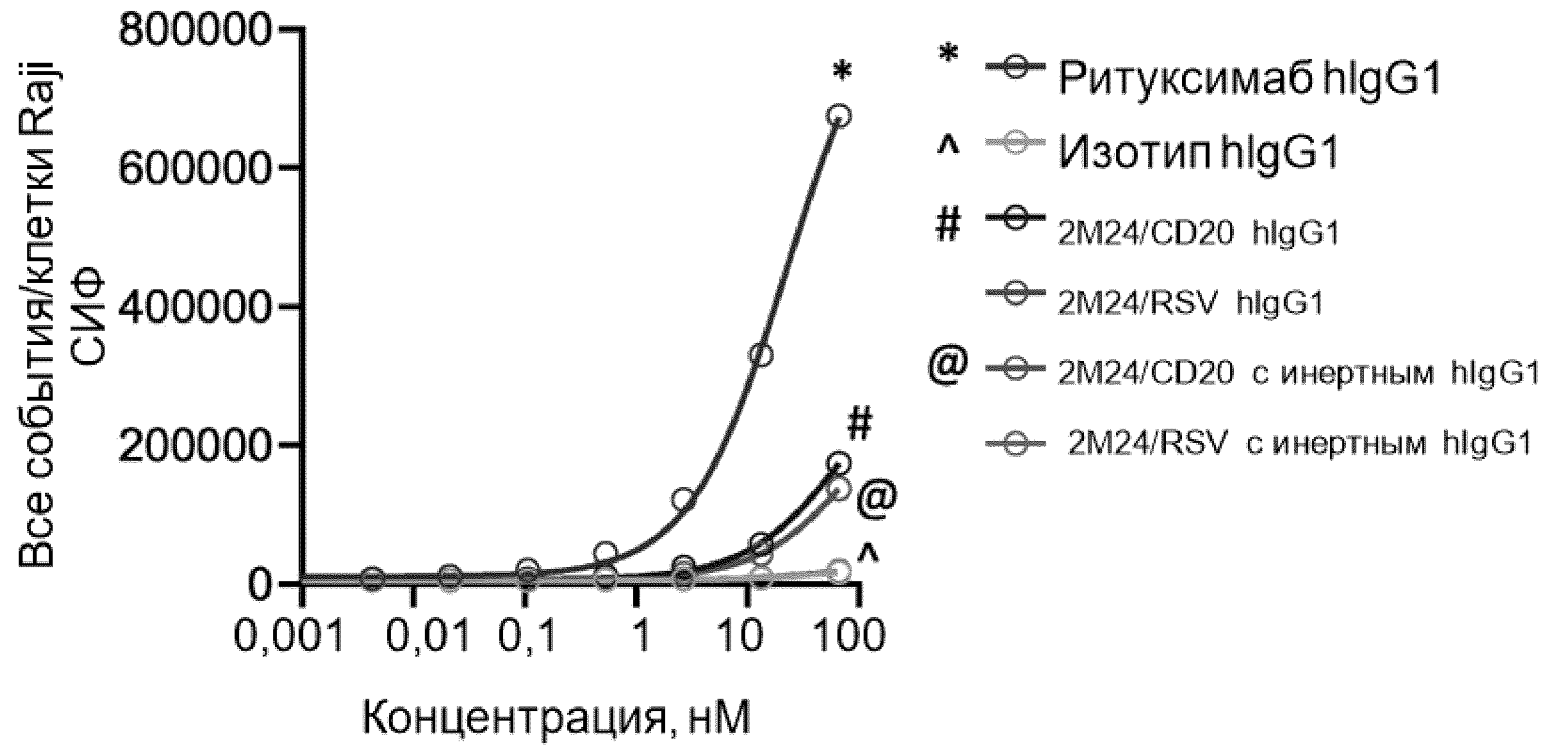
Связывание с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1



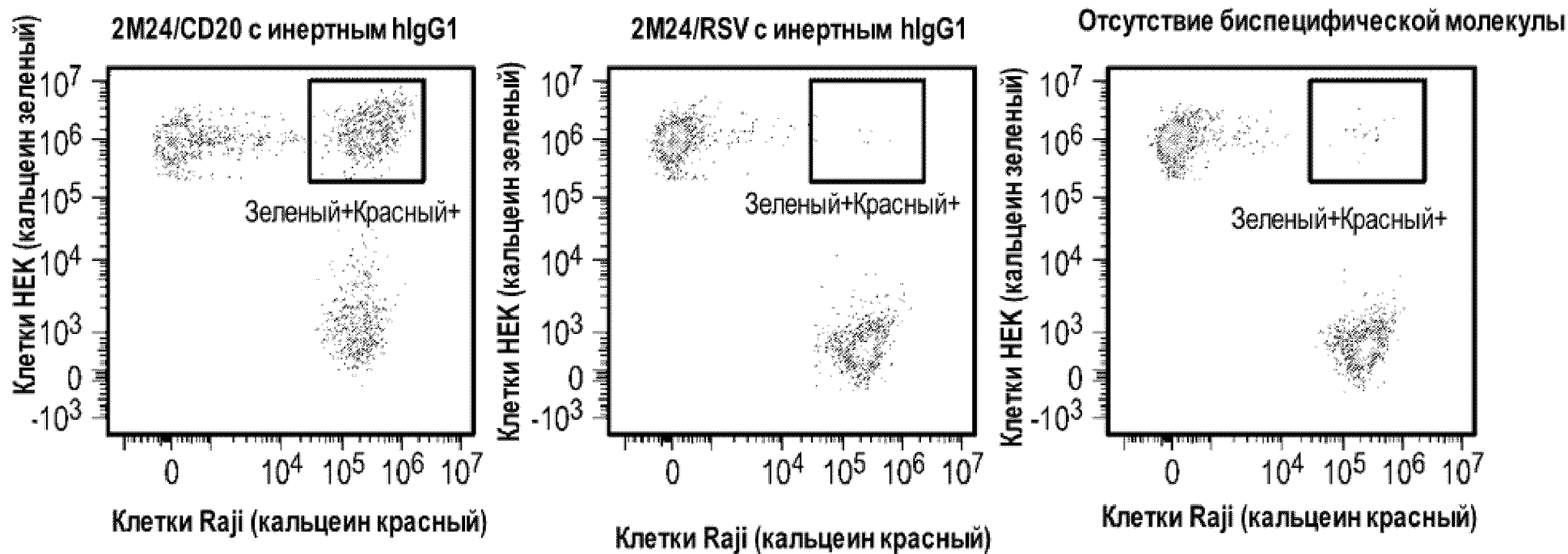
Связывание с дектином-1 в РВМС человека



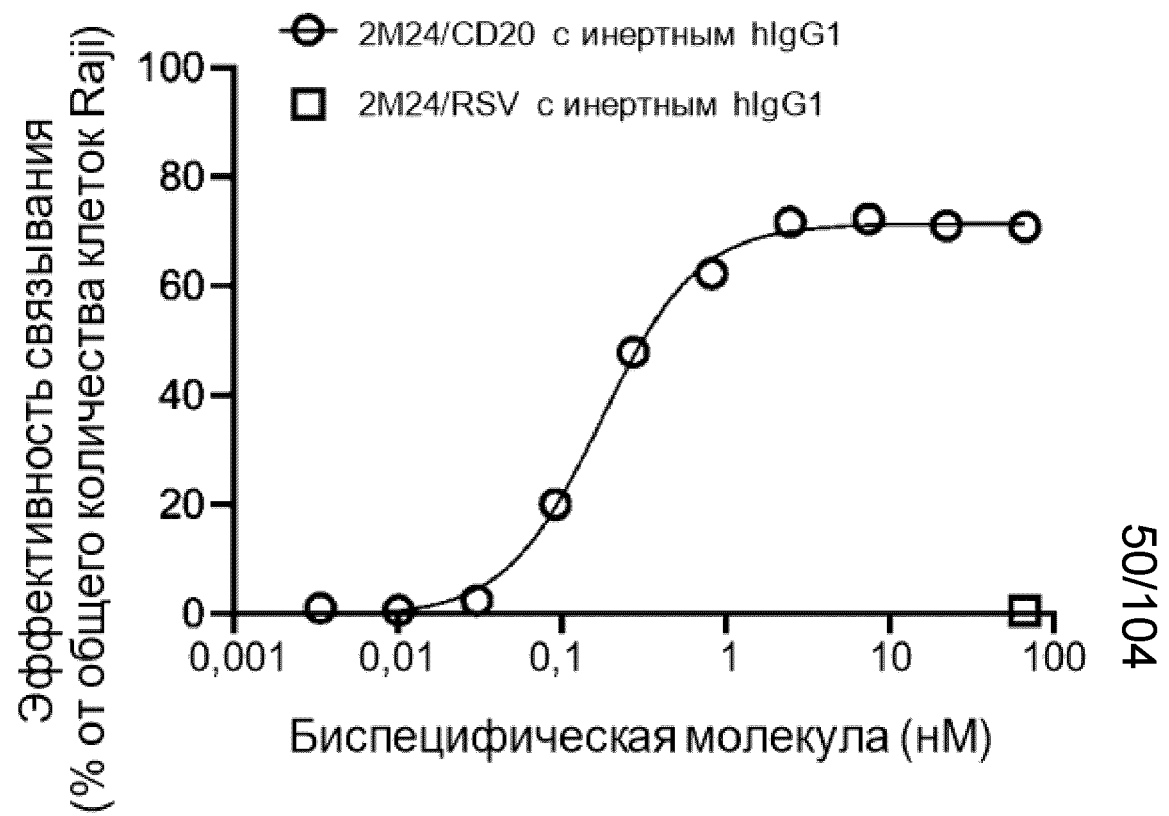
Фиг. 33А



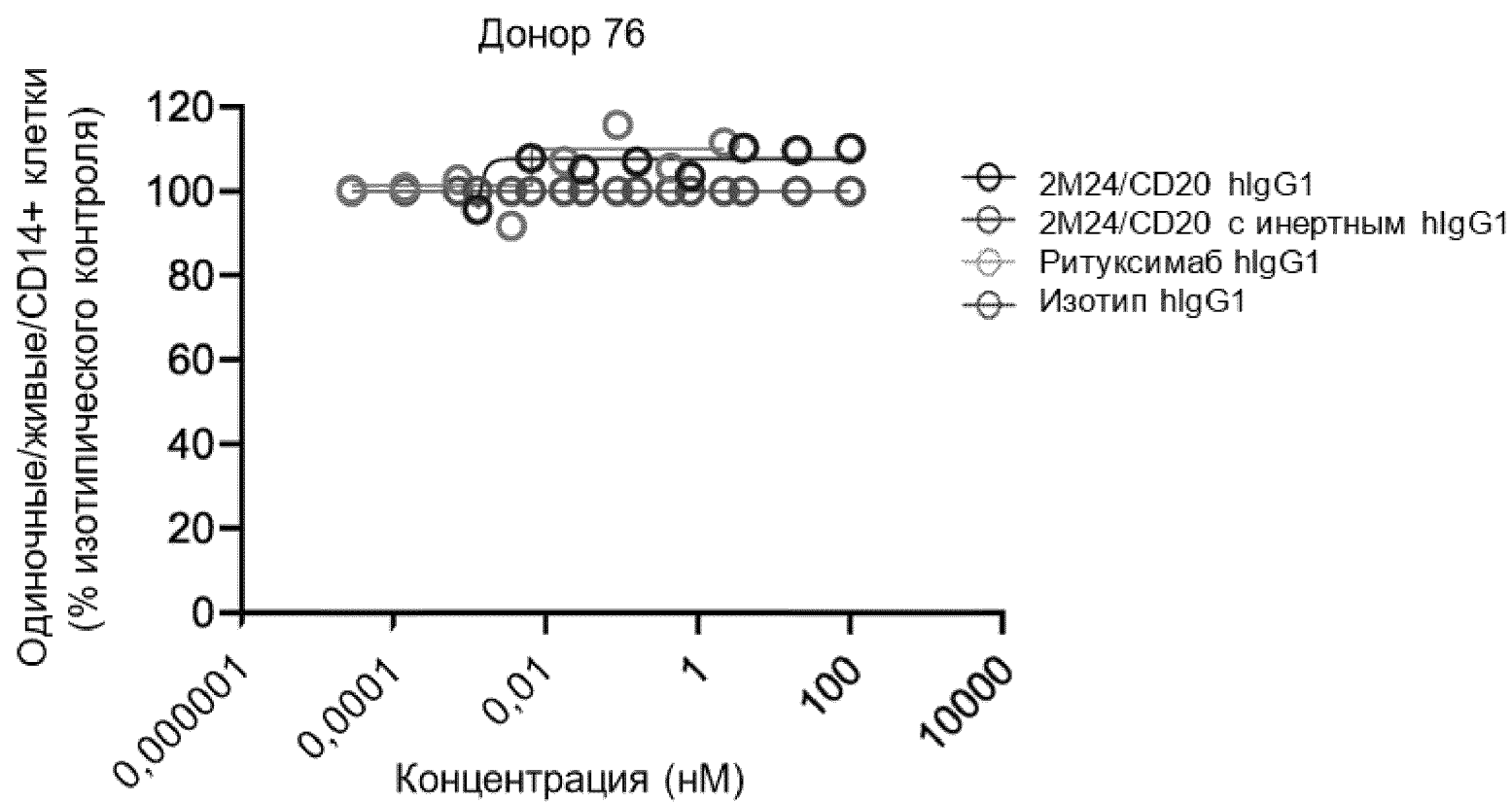
Фиг. 33В



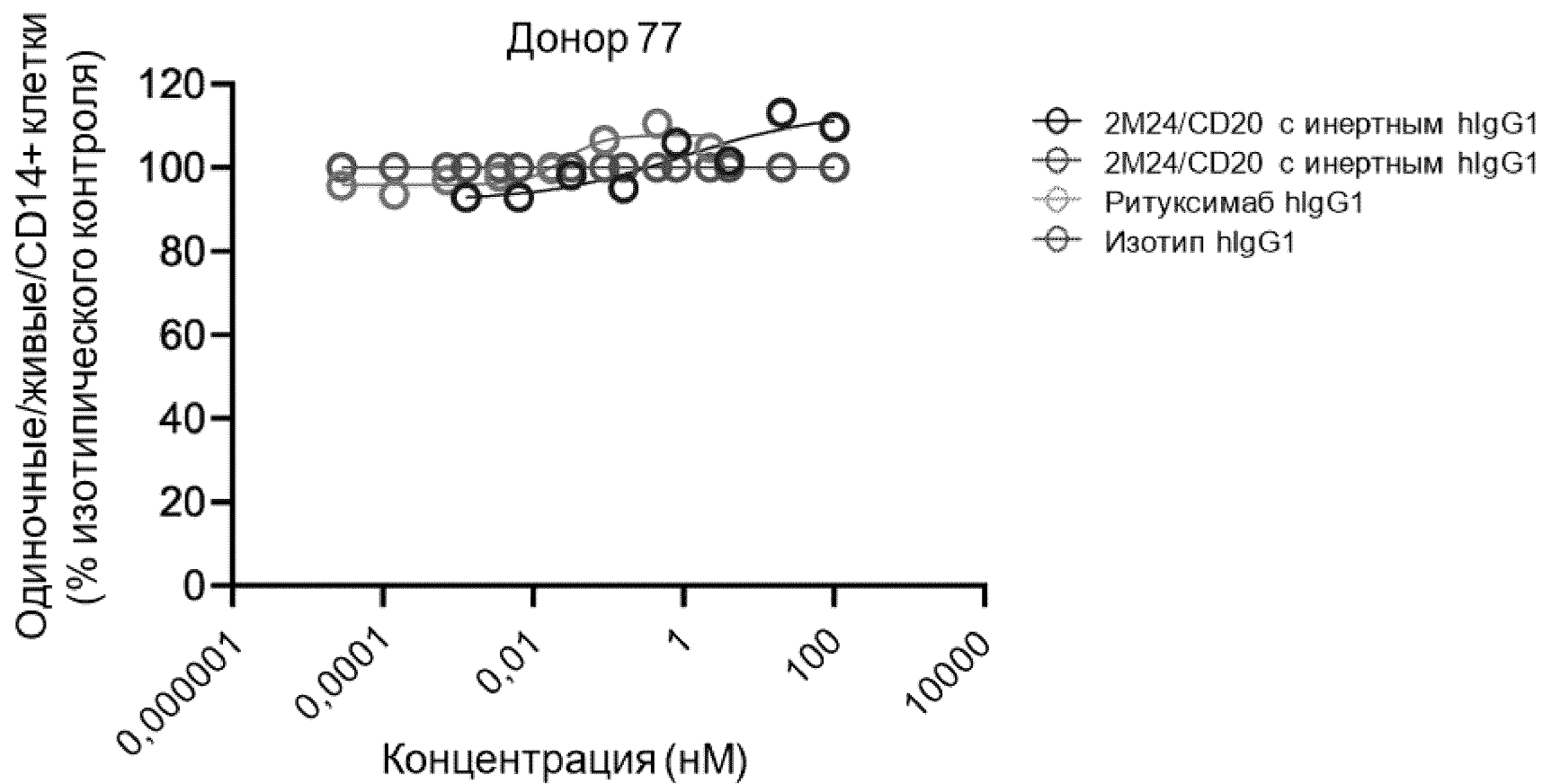
Фиг. 34А



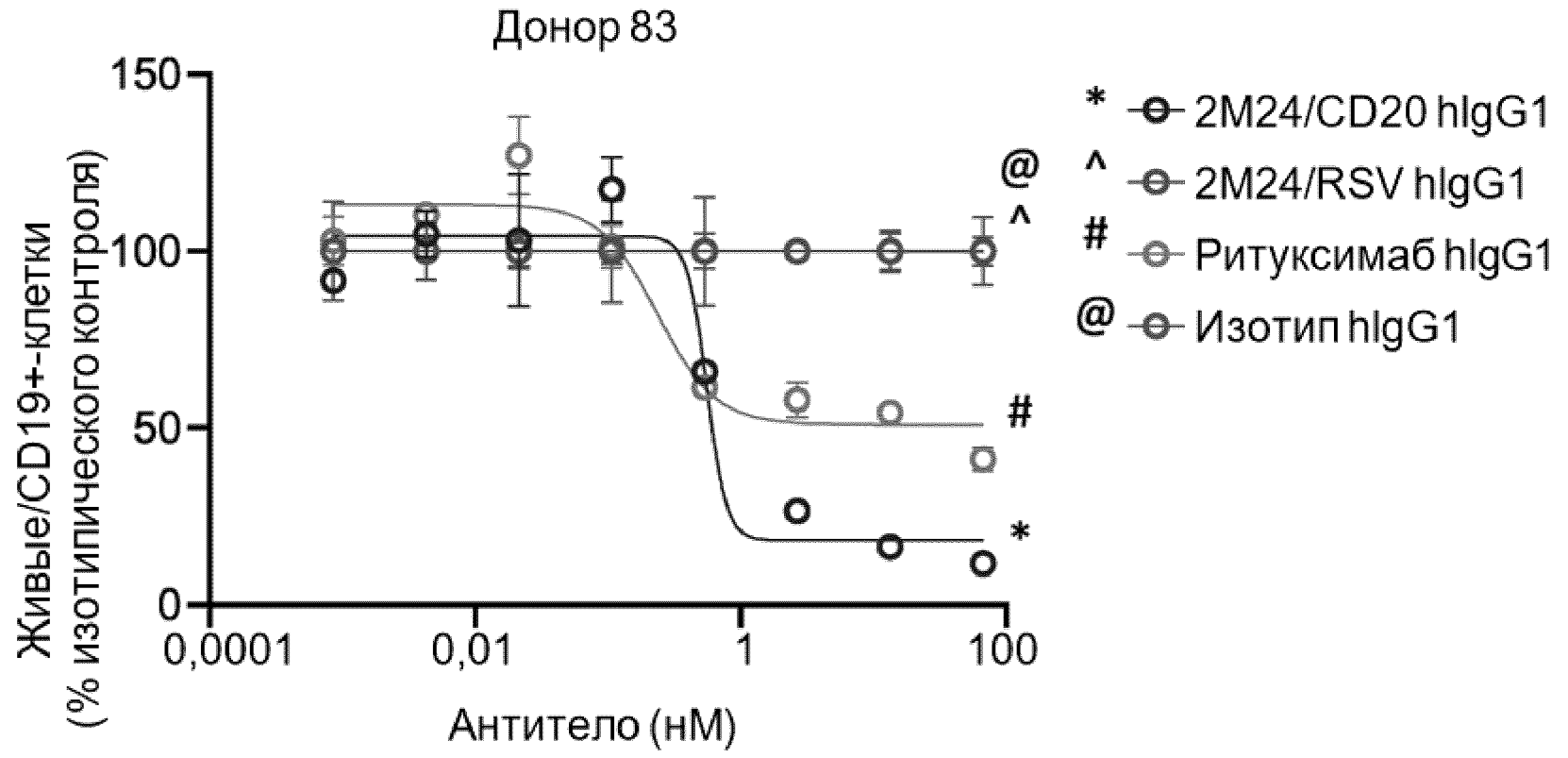
Фиг. 34В



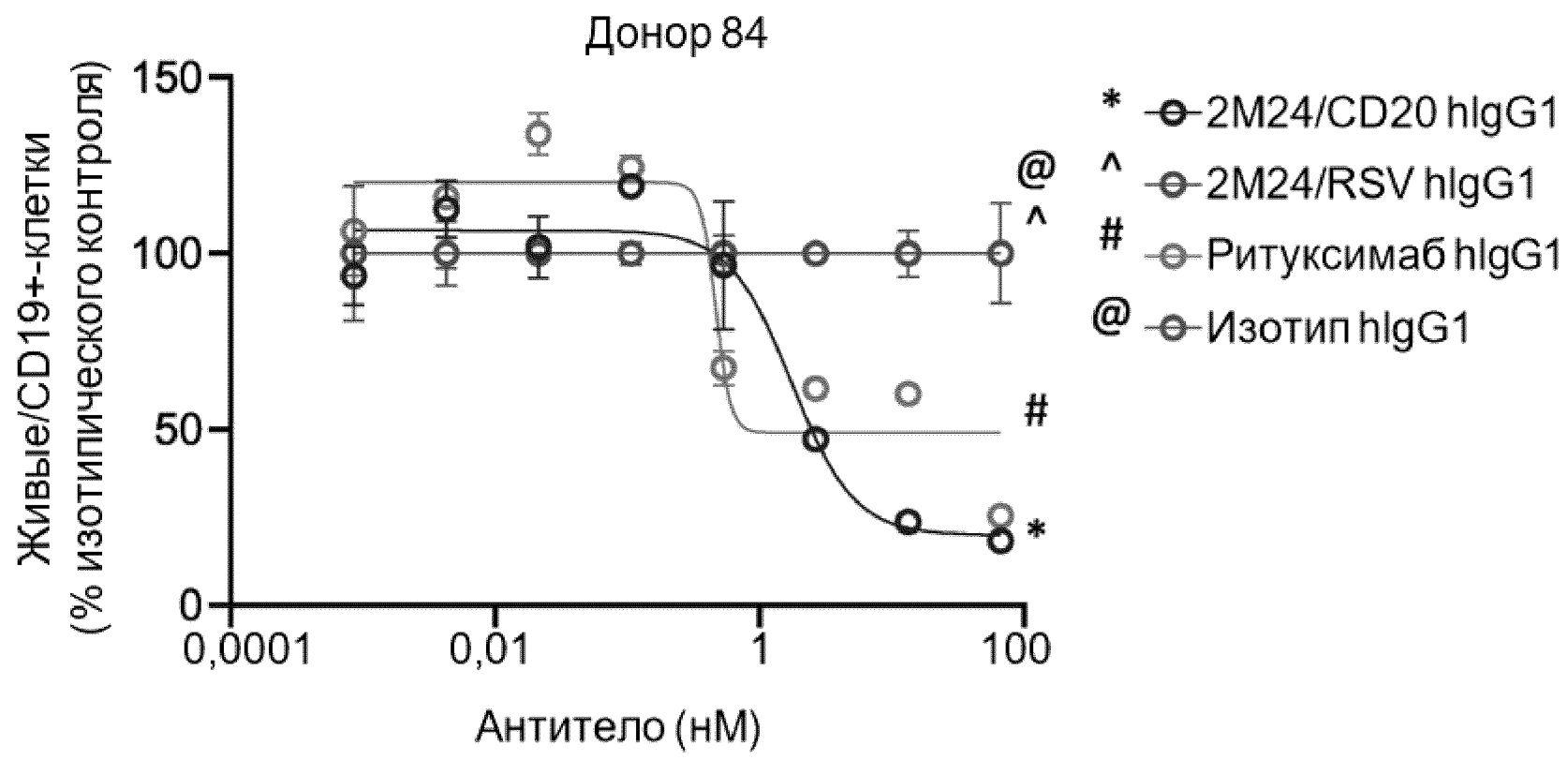
Фиг. 35А



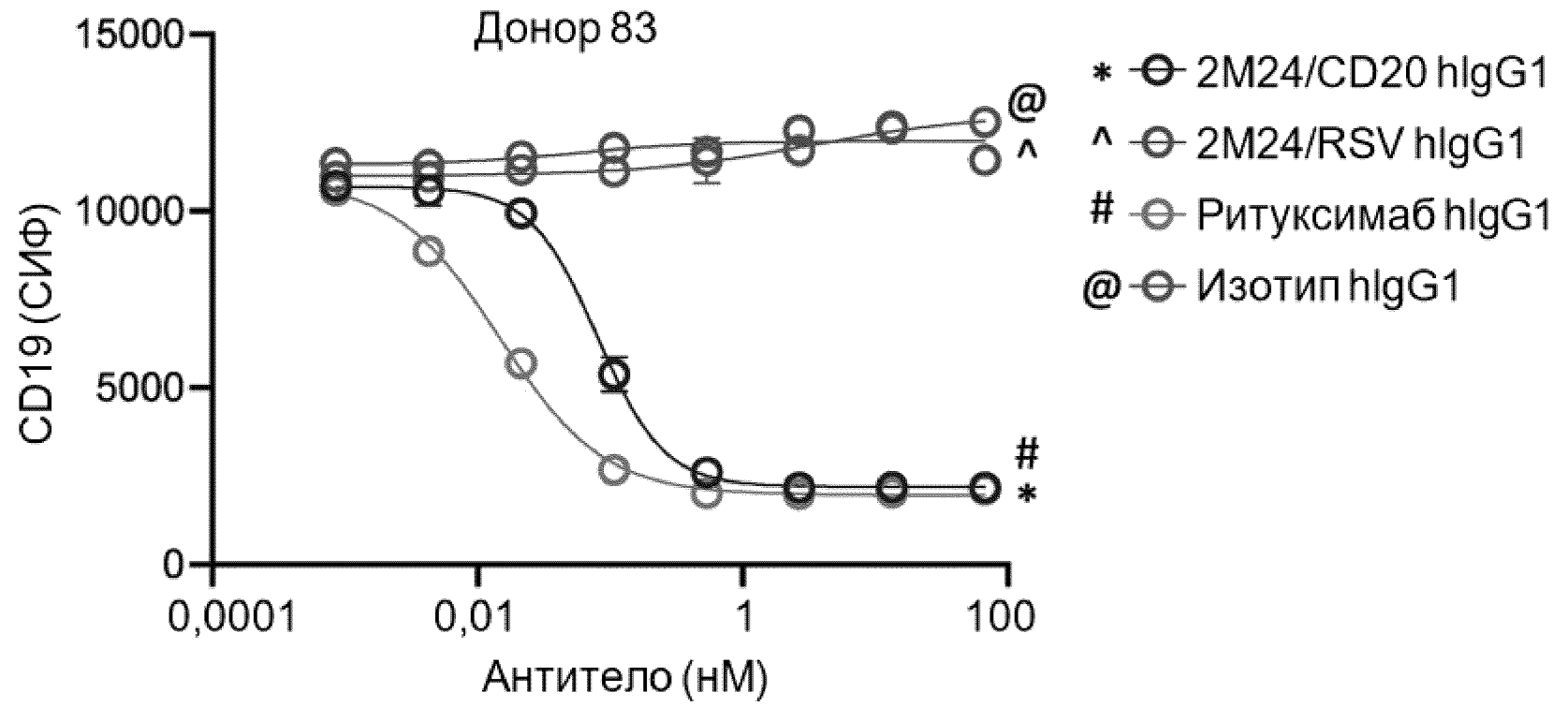
Фиг. 35В



Фиг. 36А

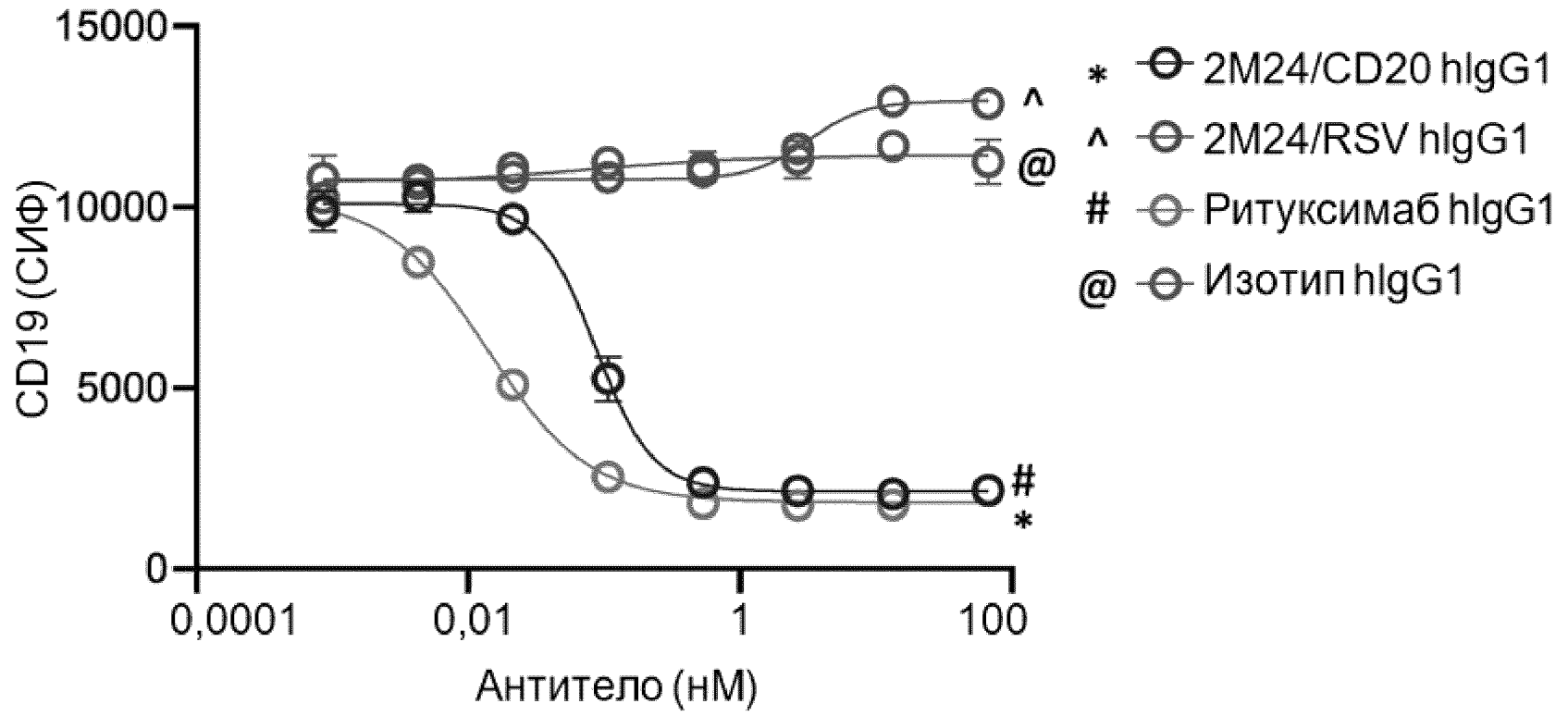


Фиг. 36В



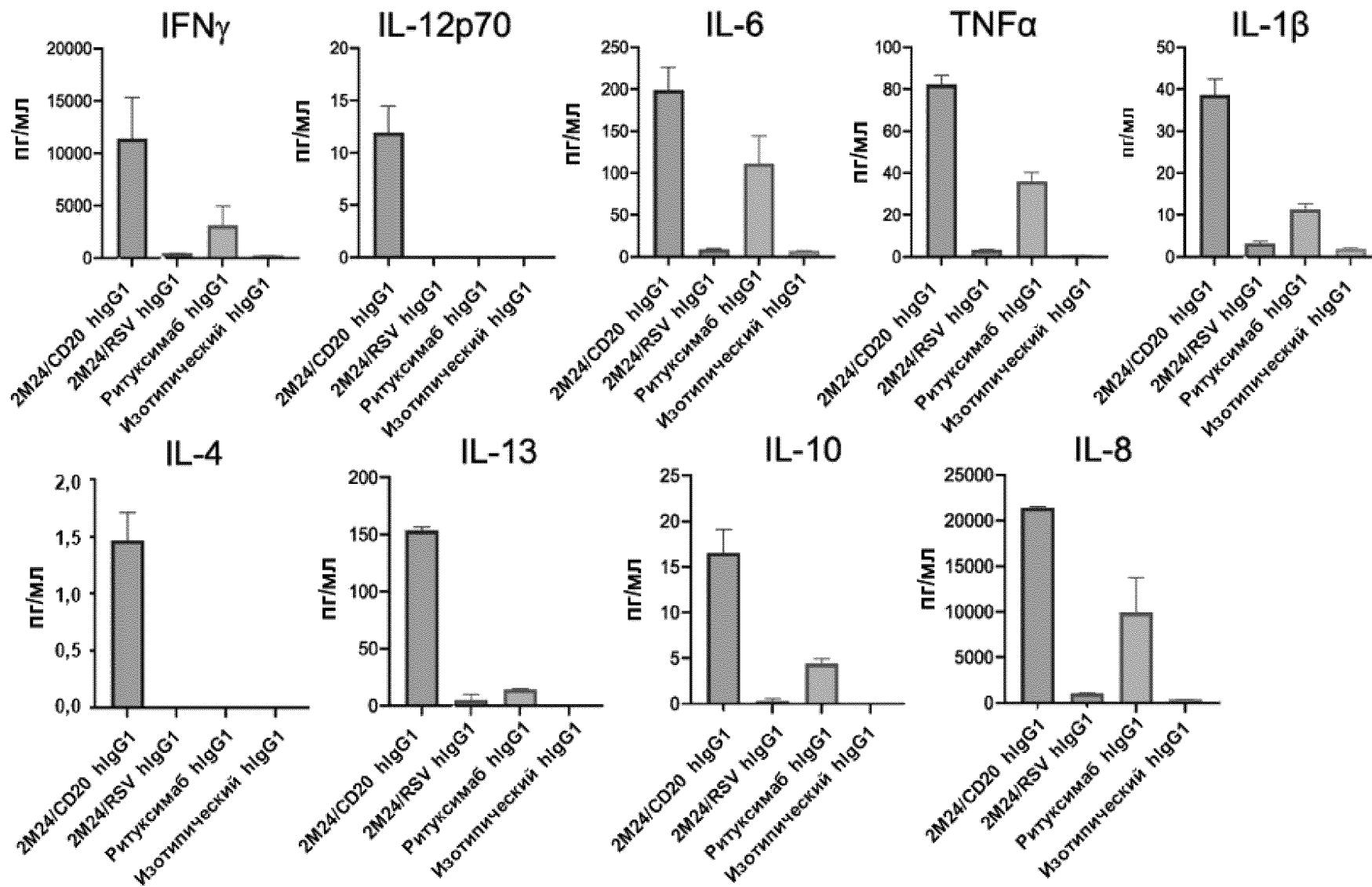
Фиг. 37А

Донор 84

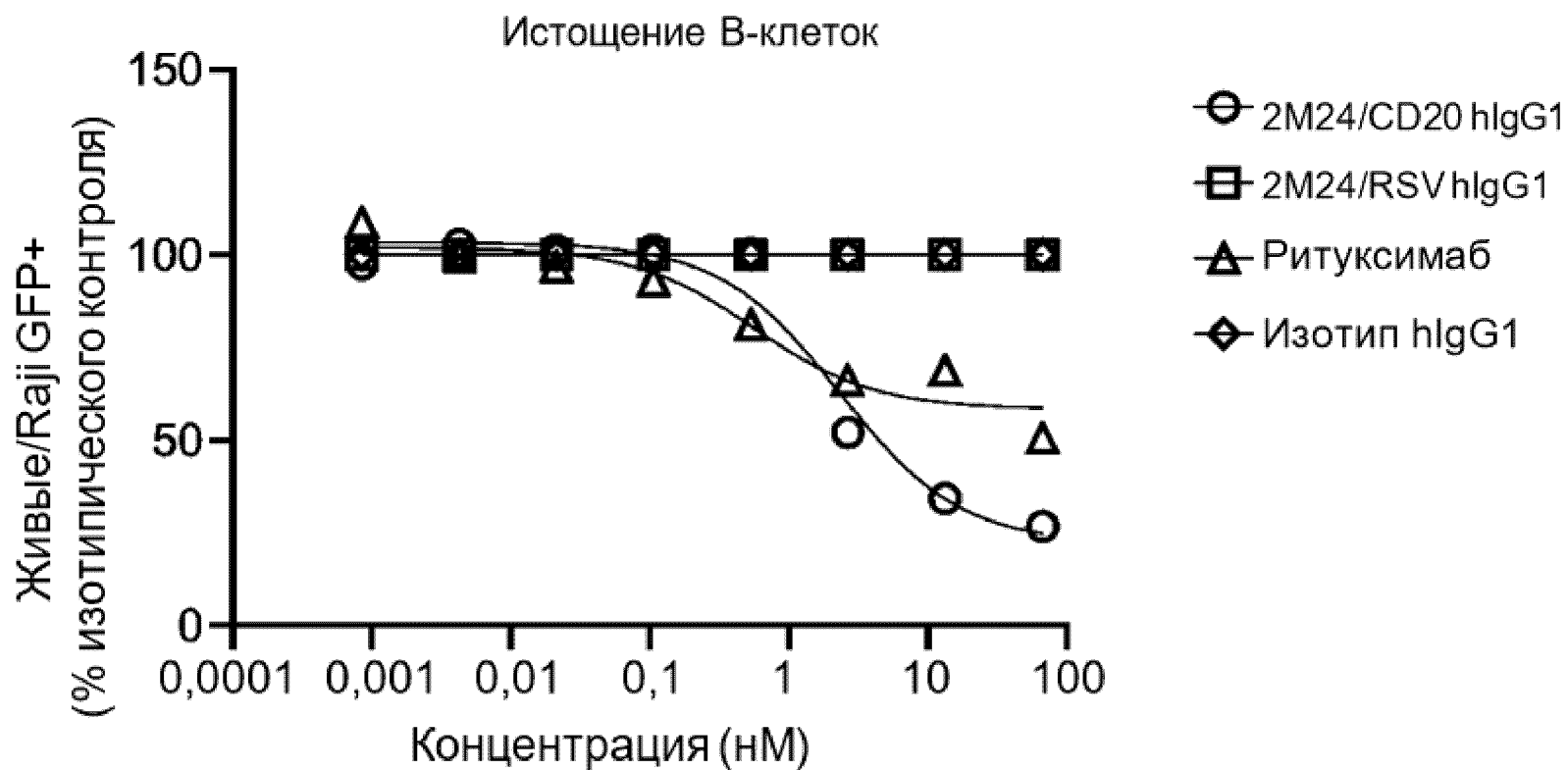


Фиг. 37В

56/104

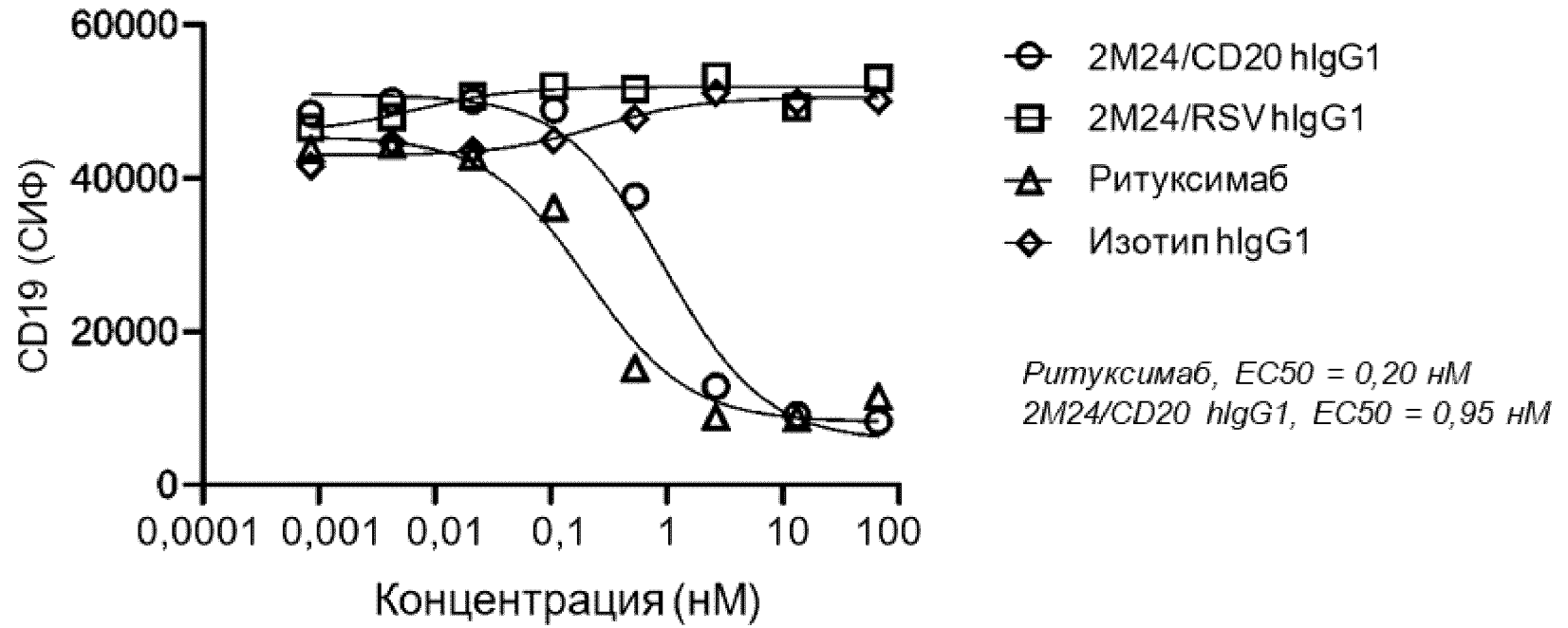


Фиг. 38

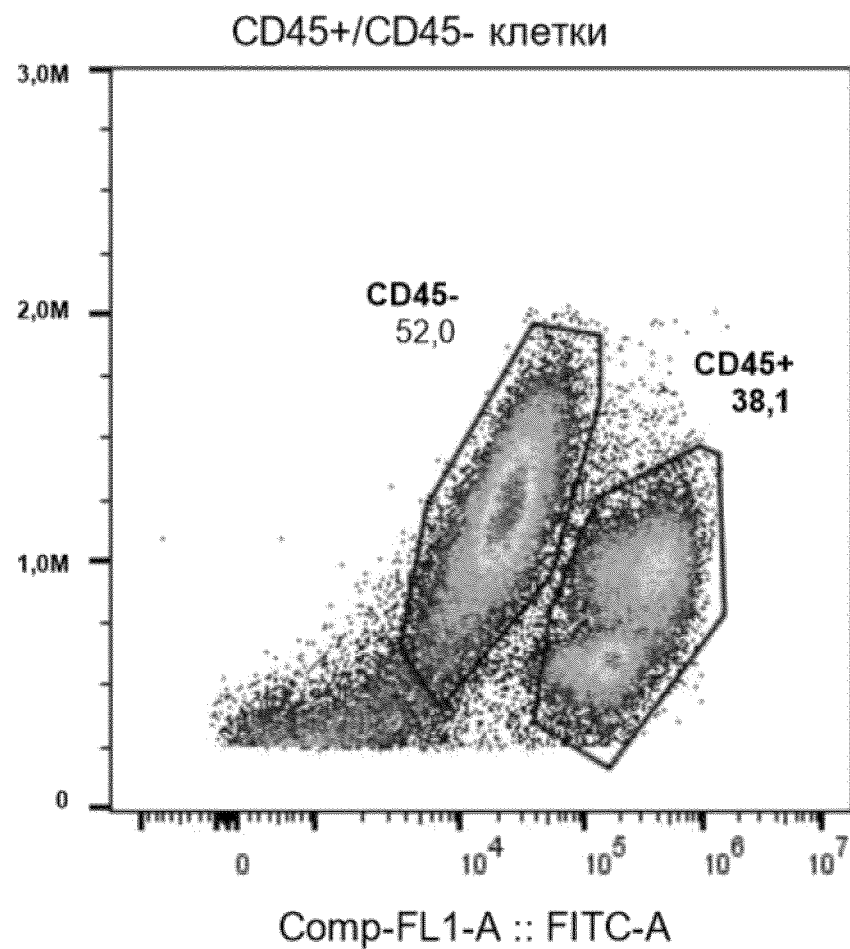
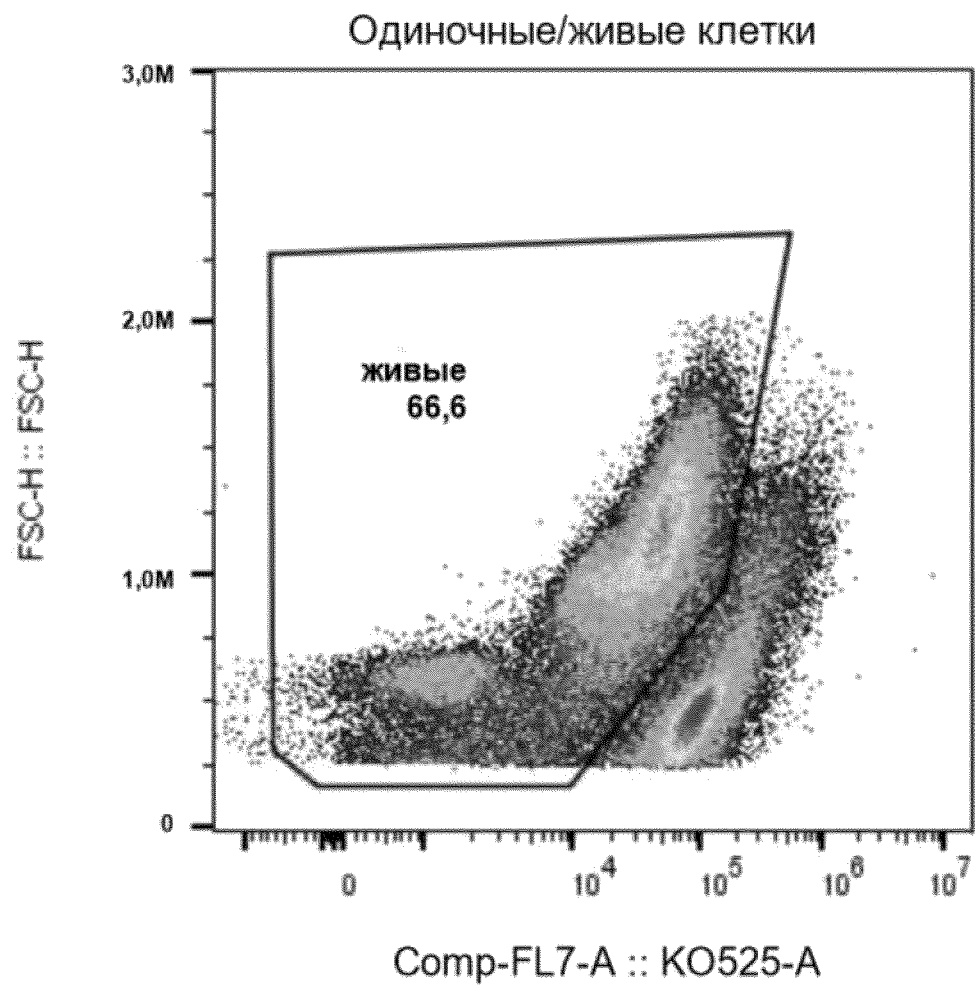


Фиг. 39А

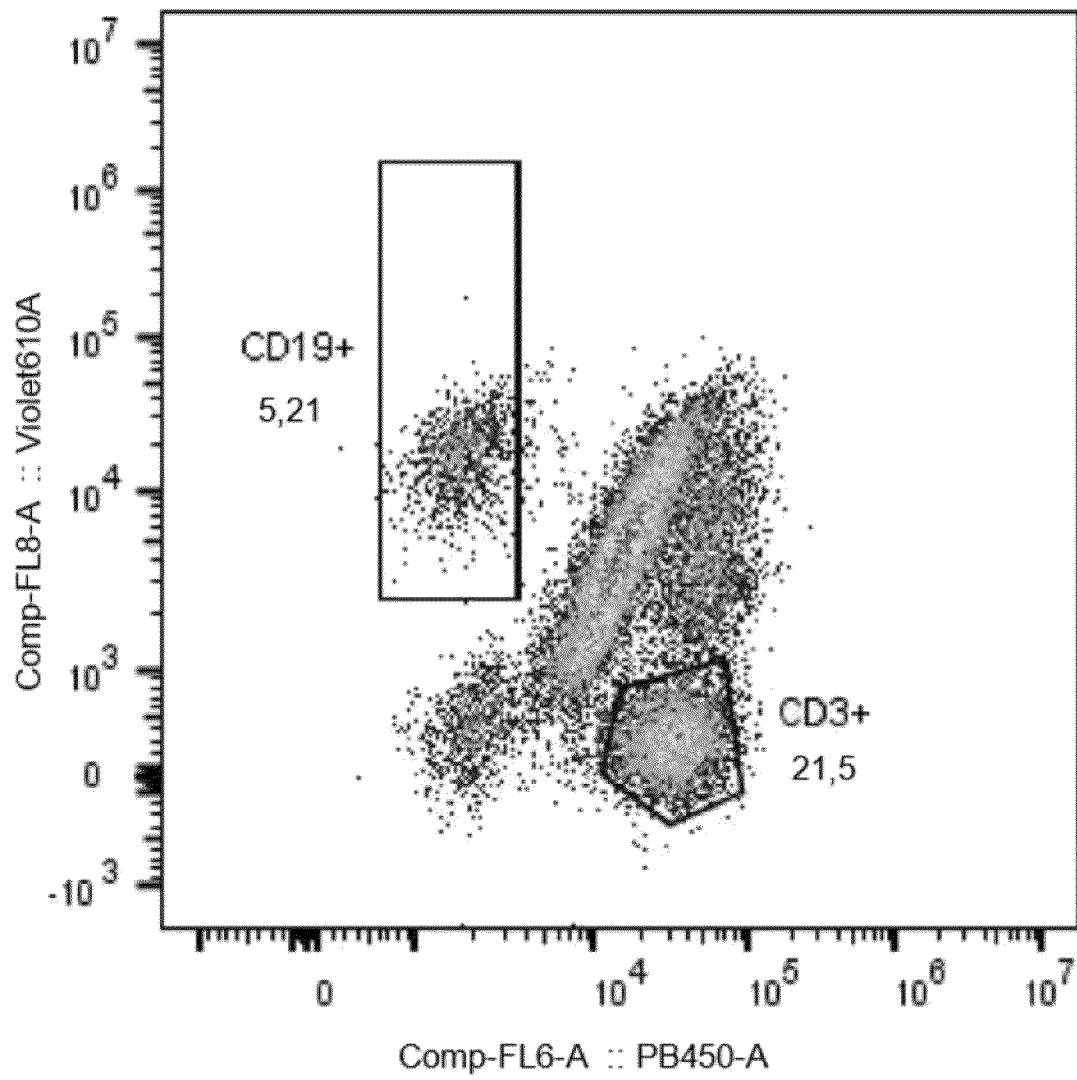
Подстригание В-клеточного рецептора



Фиг. 39В

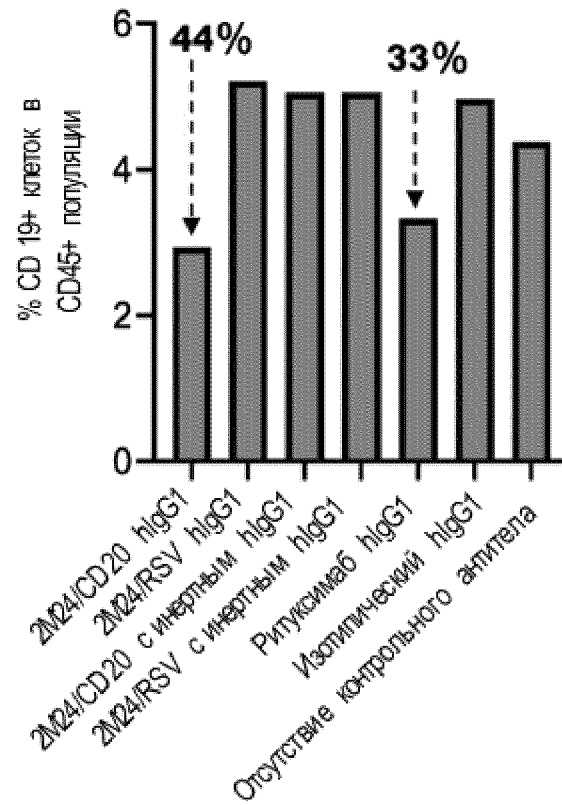


Фиг. 40А

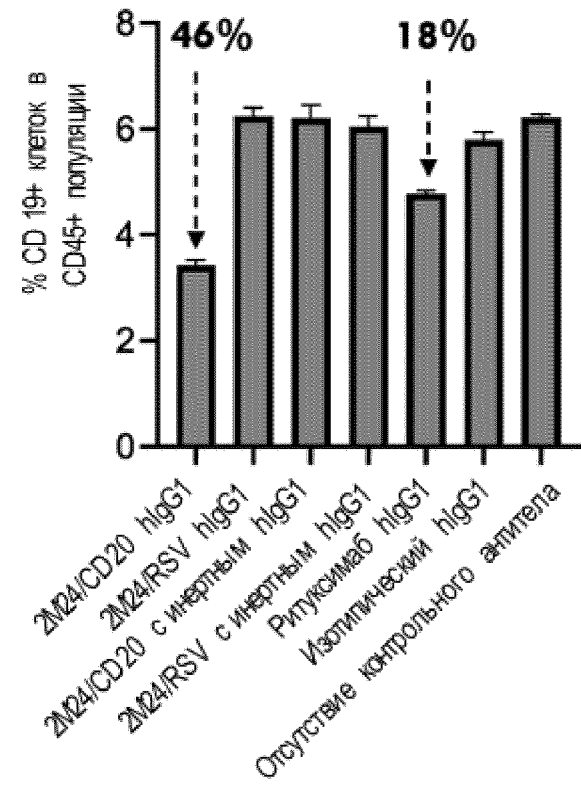


Фиг. 40В

Донор с раком почки А

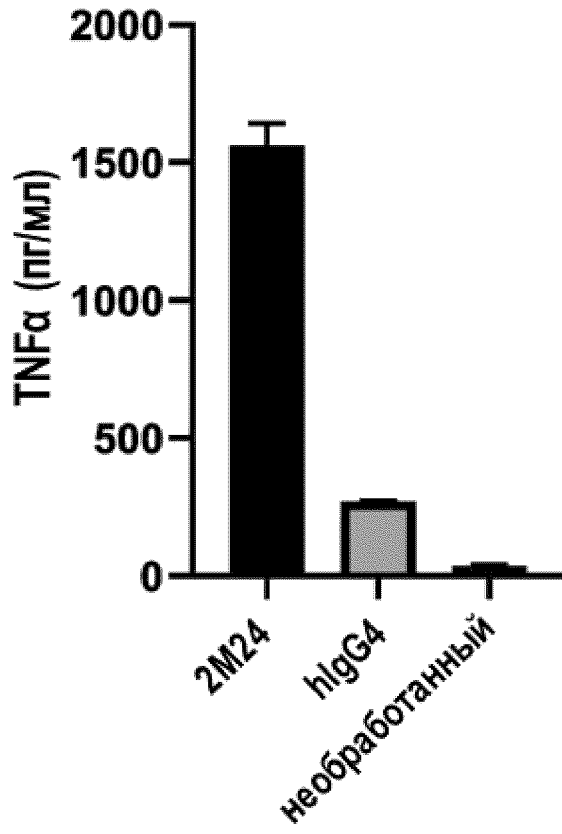


Донор с раком почки В



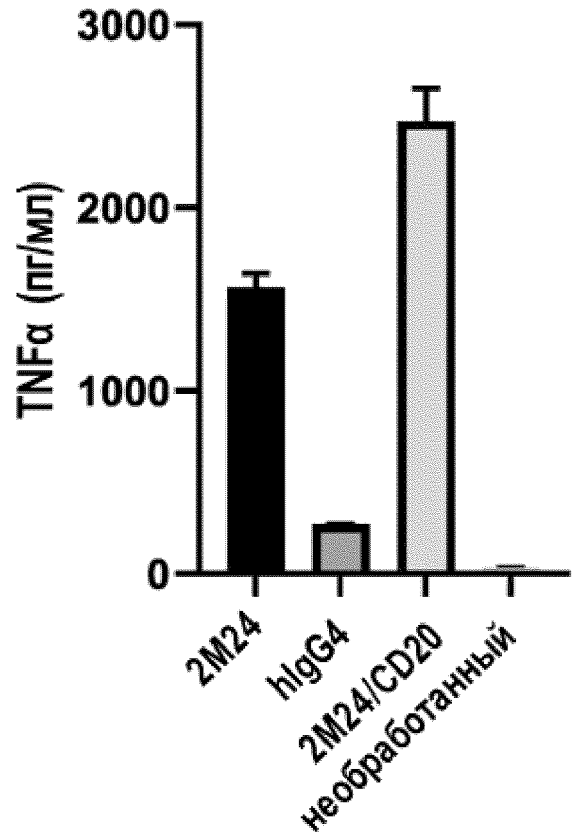
Фиг. 40С

Иммобилизованное Ат 2M24, инкубированное с макрофагами



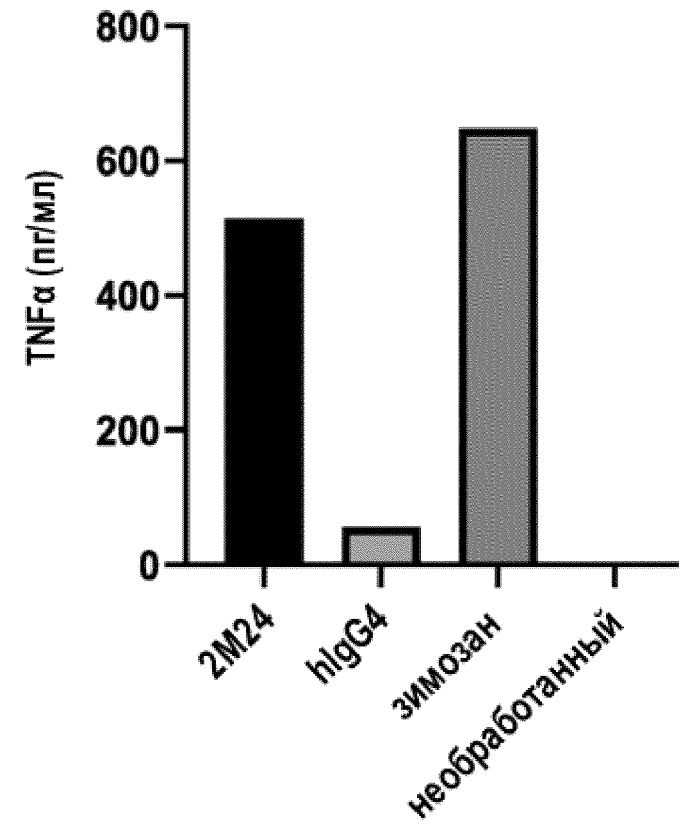
Фиг. 41А

Иммобилизованное 2M24 или биспецифическая молекула 2M24/анти-hCD20, инкубированное с макрофагами

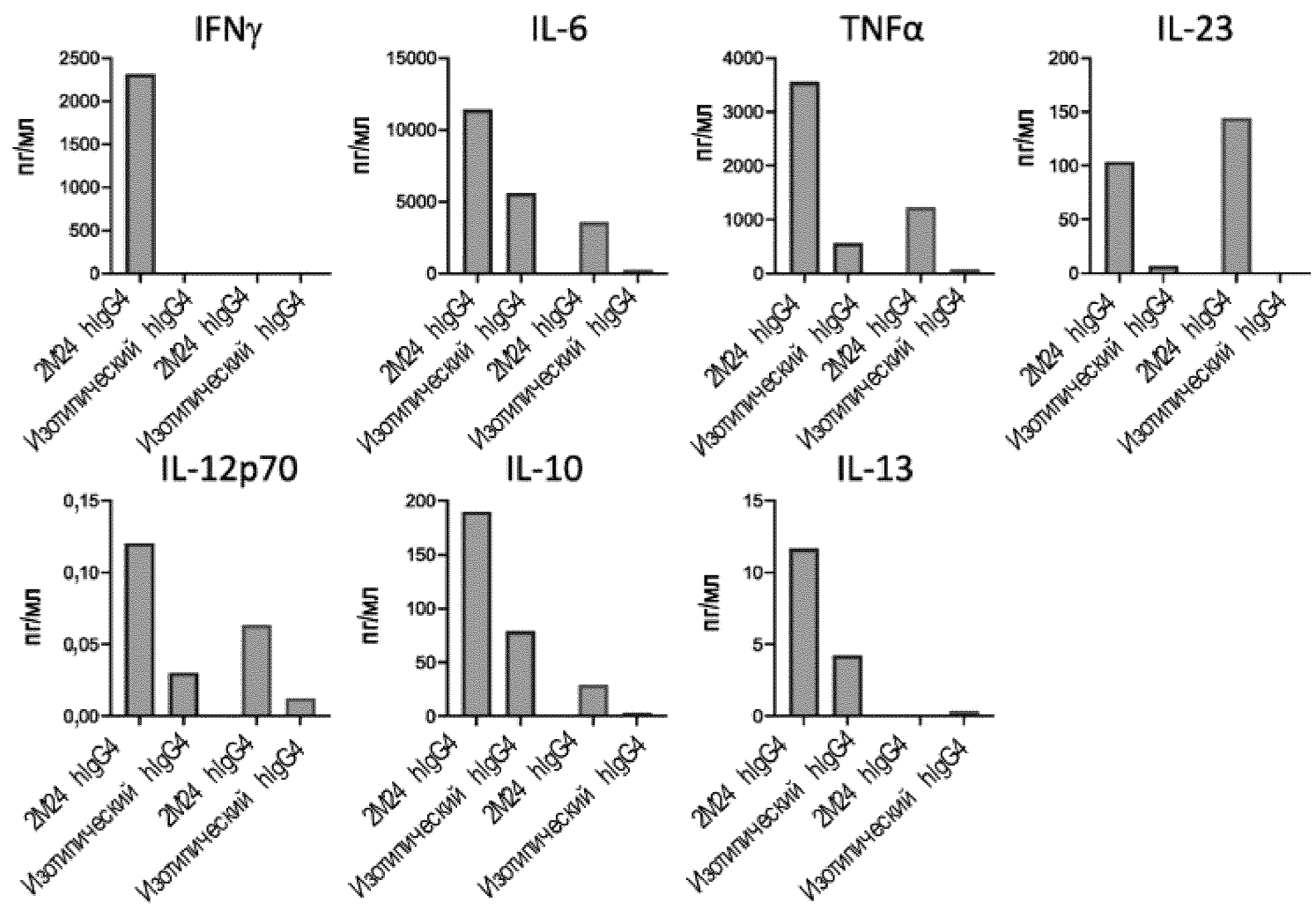


Фиг. 41В

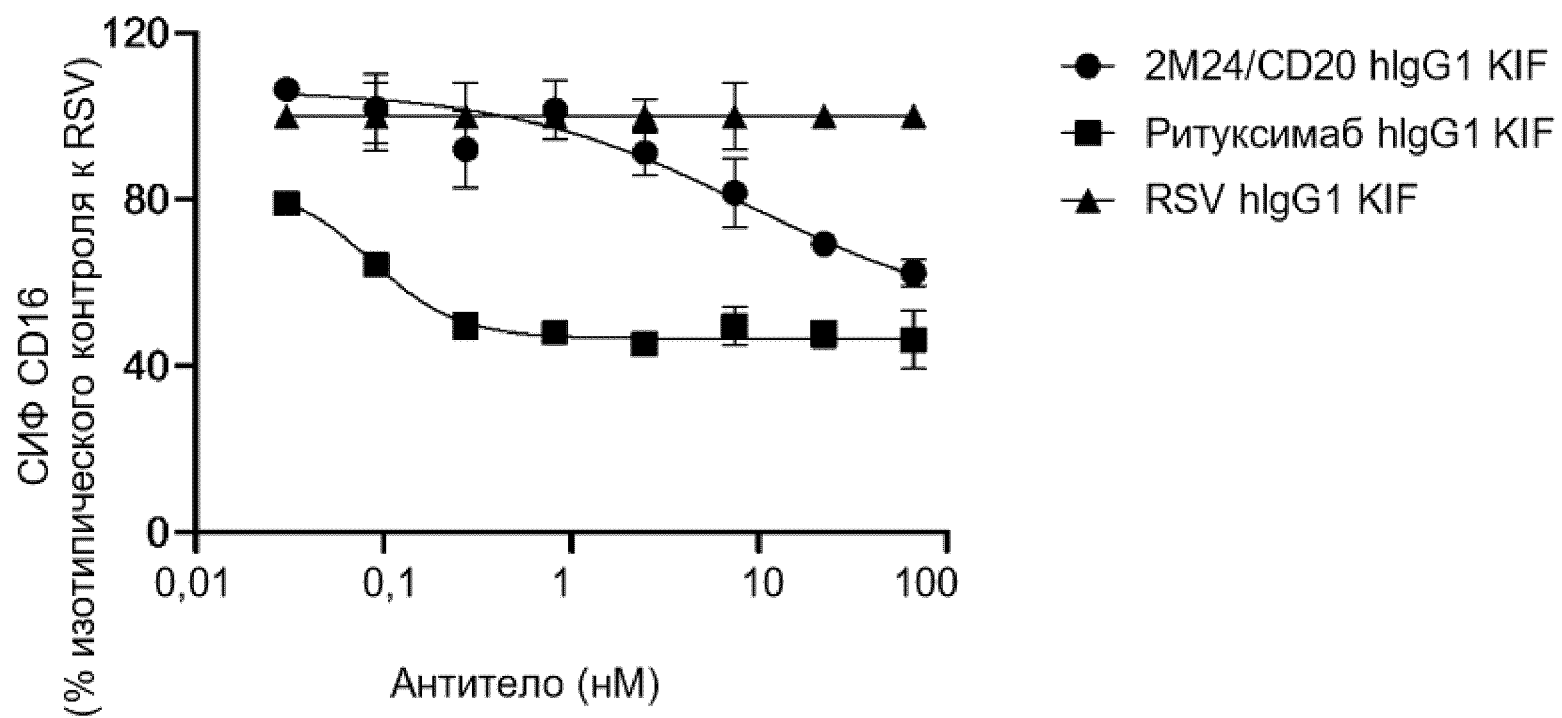
Иммобилизованное 2M24 индуцирует высвобождение TNFα в гомогенат, полученный из одиночных клеток, из биоптата рака почки



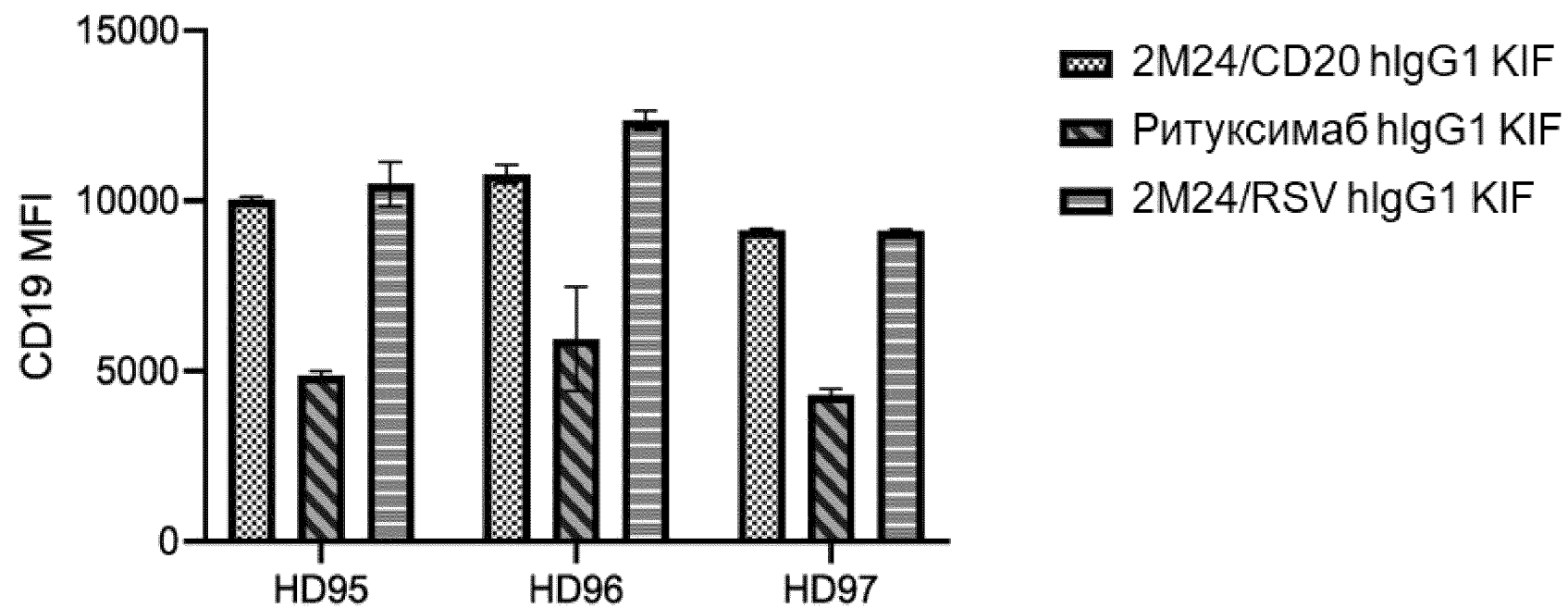
Фиг. 41С



Фиг. 42

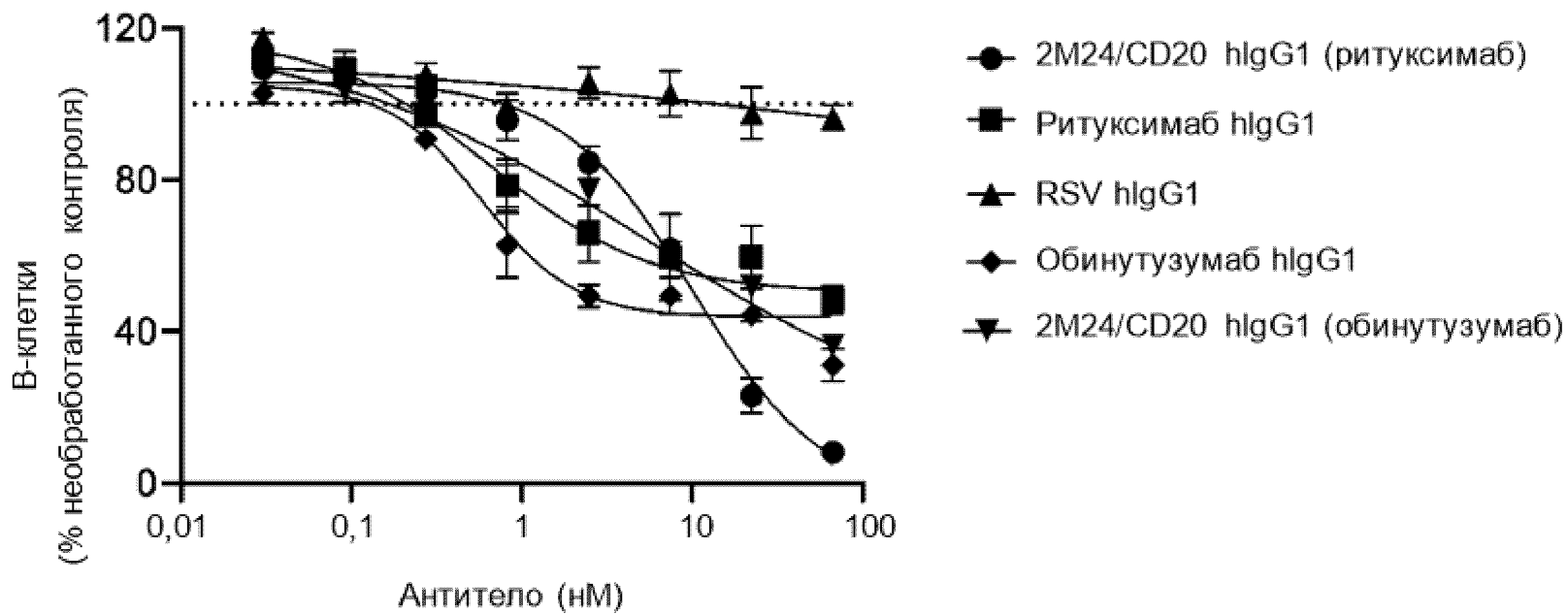


Фиг. 43

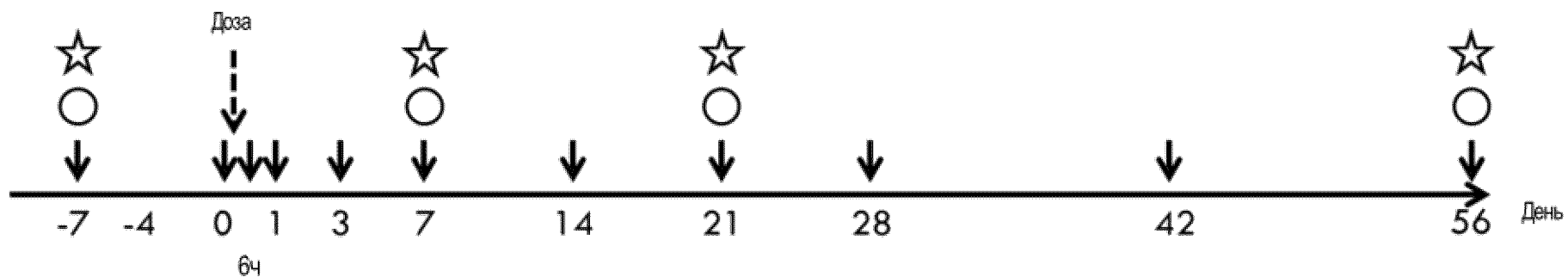


Фиг. 44

Истощение В-клеток в РВМС здоровых доноров



Фиг. 45



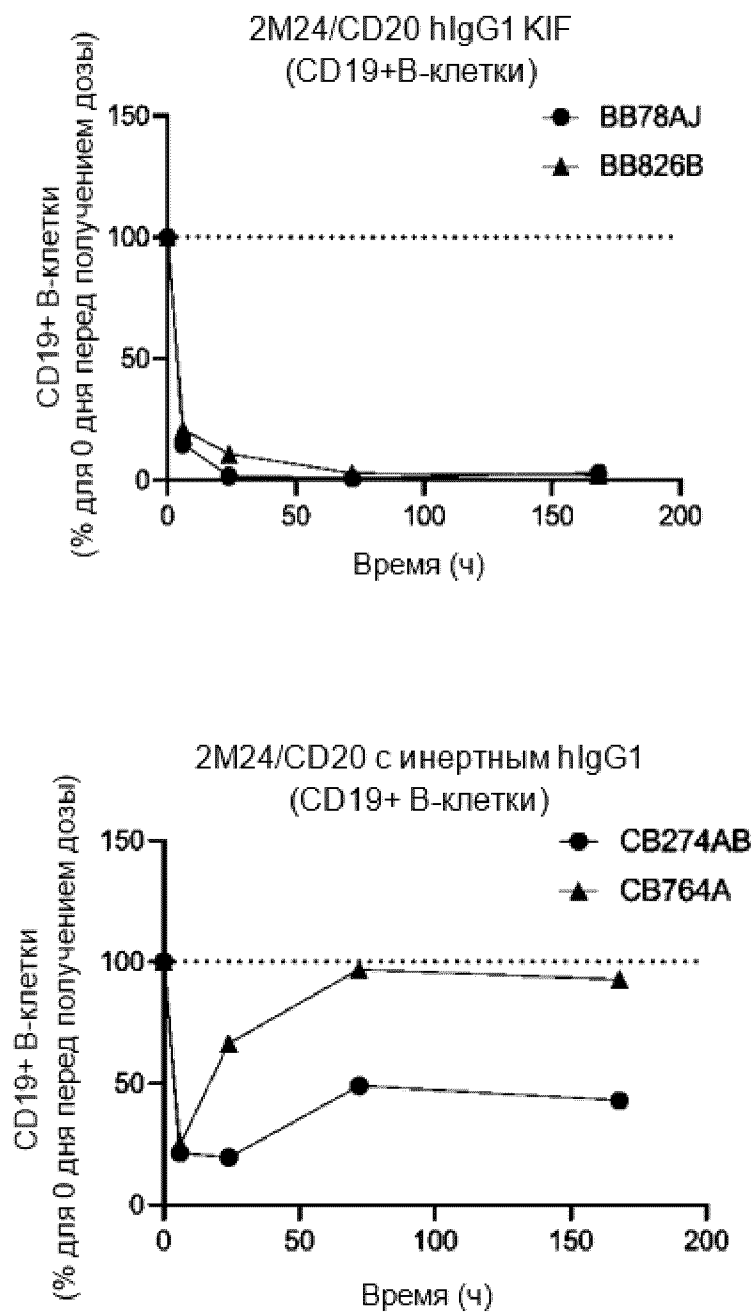
↓ Цельная кровь: ОАК, проточная цитометрия, сывороточный цитокин и ФК

○ Собранные ткани: КМ, ЛУ, ткань толстой кишки

☆ Цельная кровь: Биохимия, коагуляция

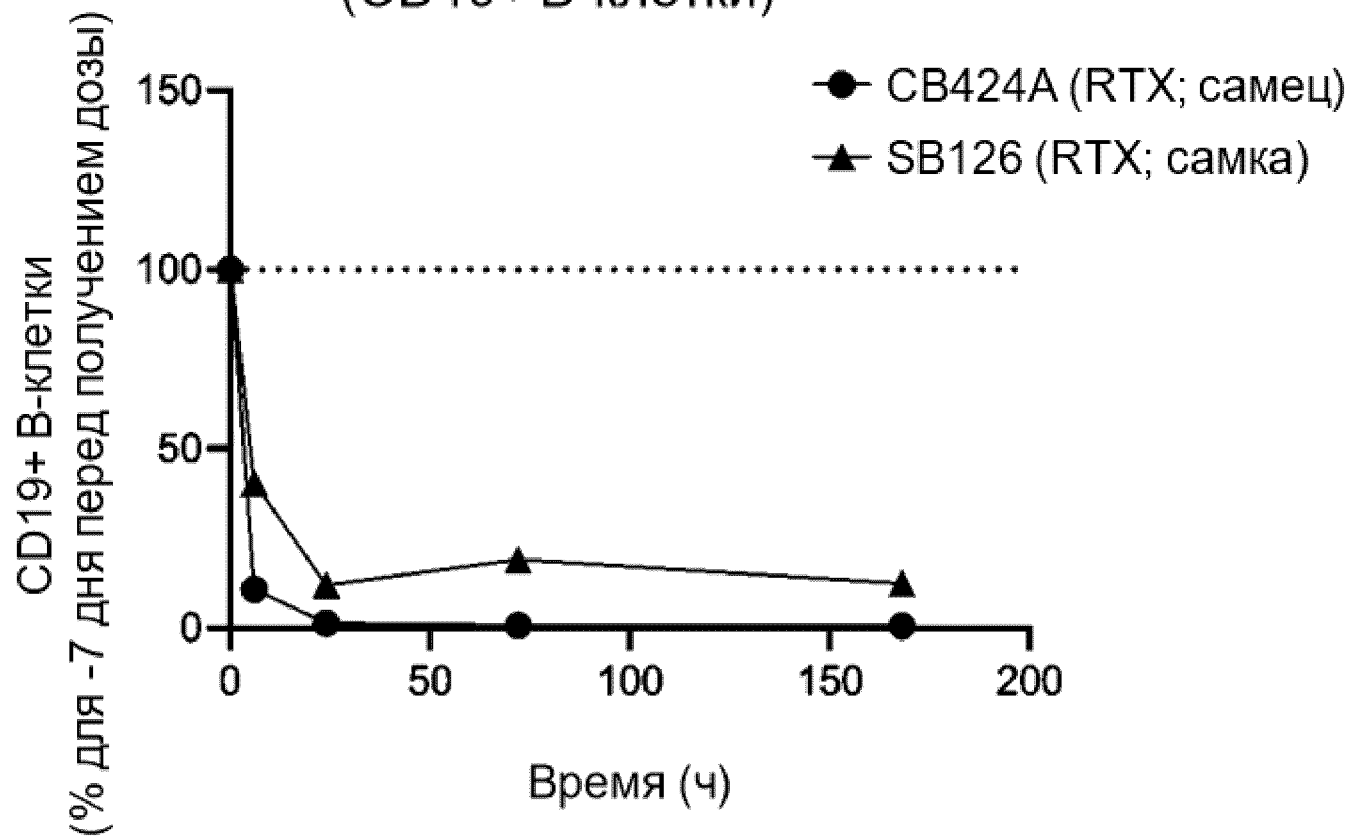
Фиг. 46

69/104



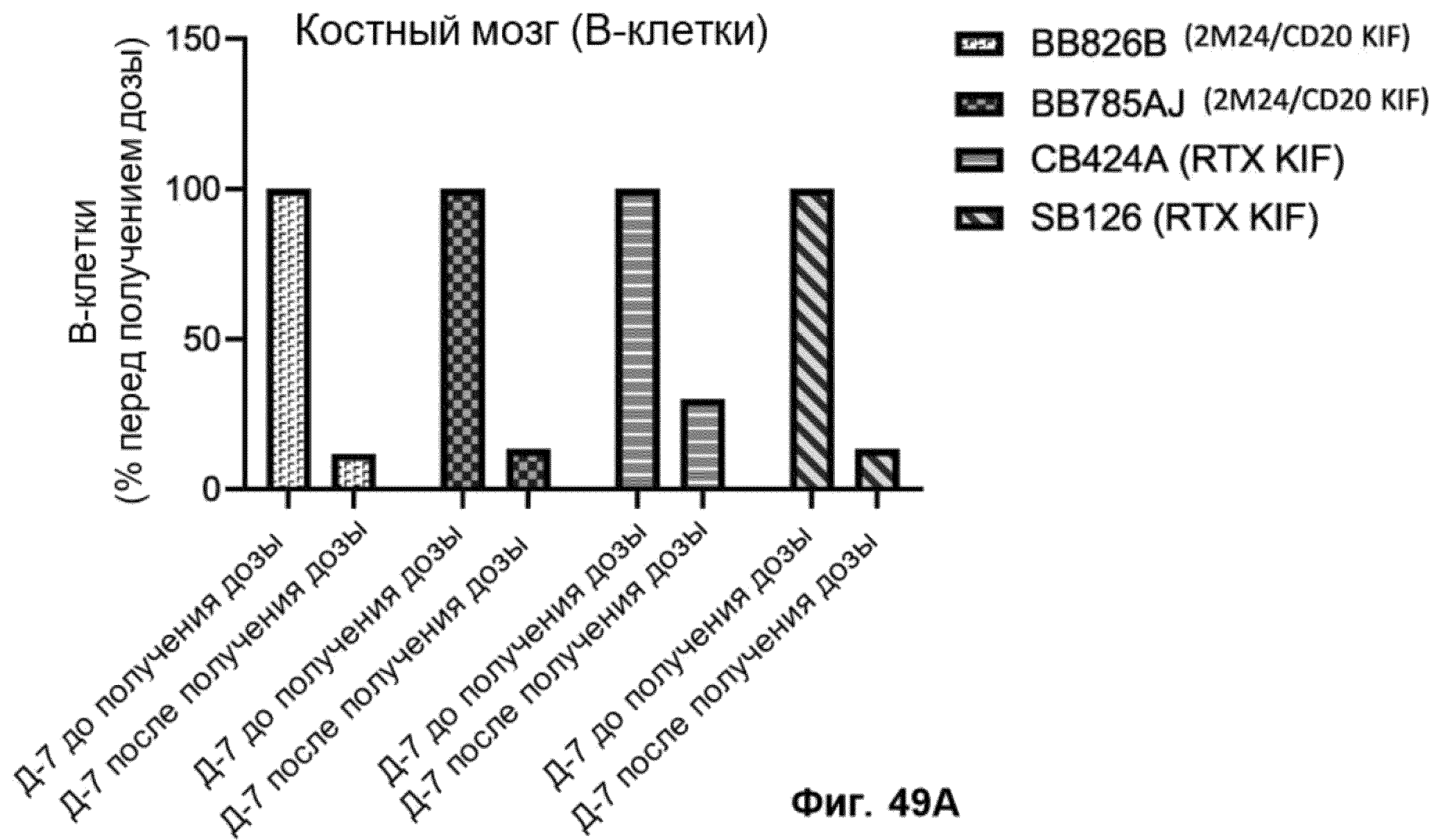
Фиг. 47

Ритуксимаб hIgG1 KIF
(CD19+ В-клетки)



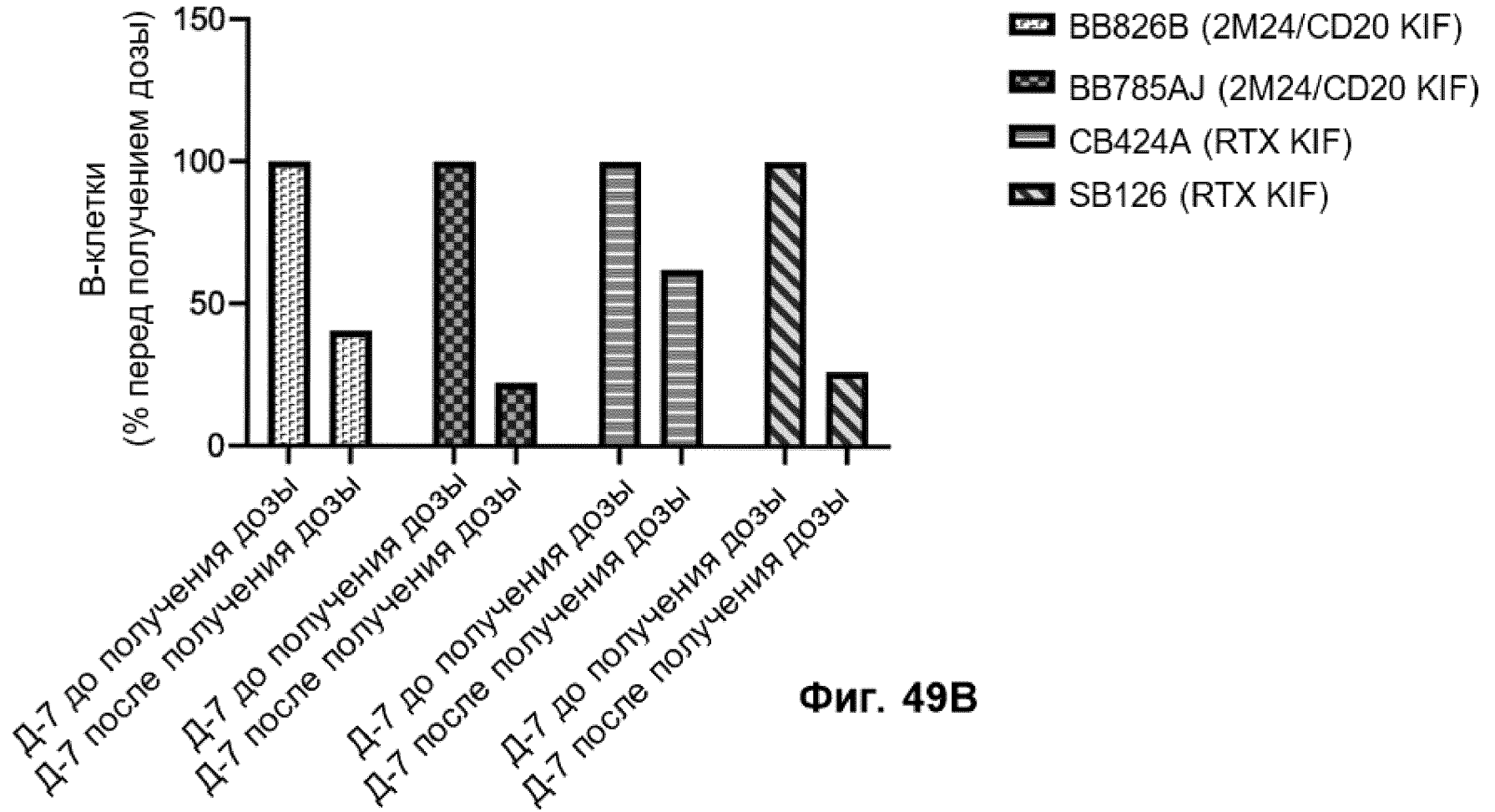
70/104

Фиг. 48



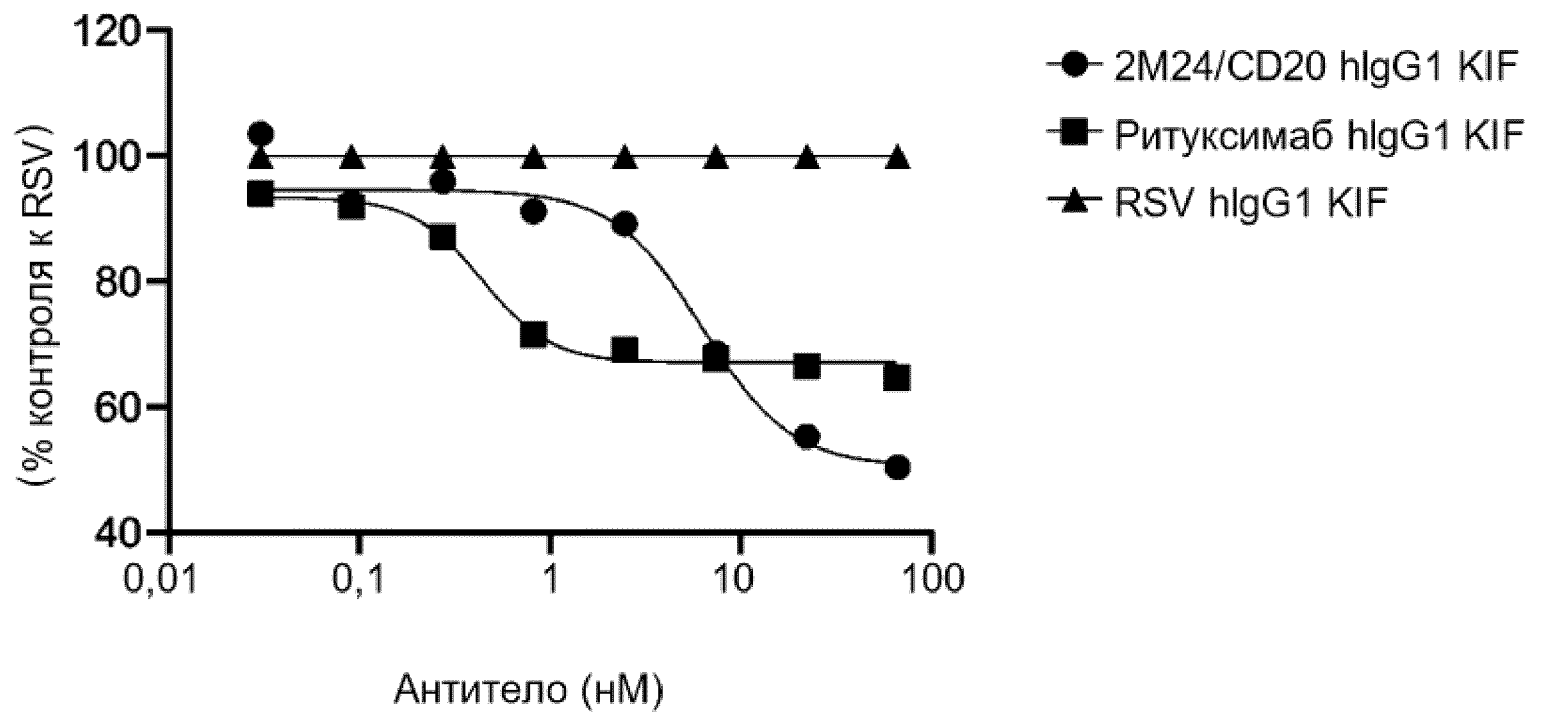
Фиг. 49А

Лимфатический узел (В-клетки)



Фиг. 49В

Истощение В-клеток в РВМС яванского макака



Фиг. 50

74/104

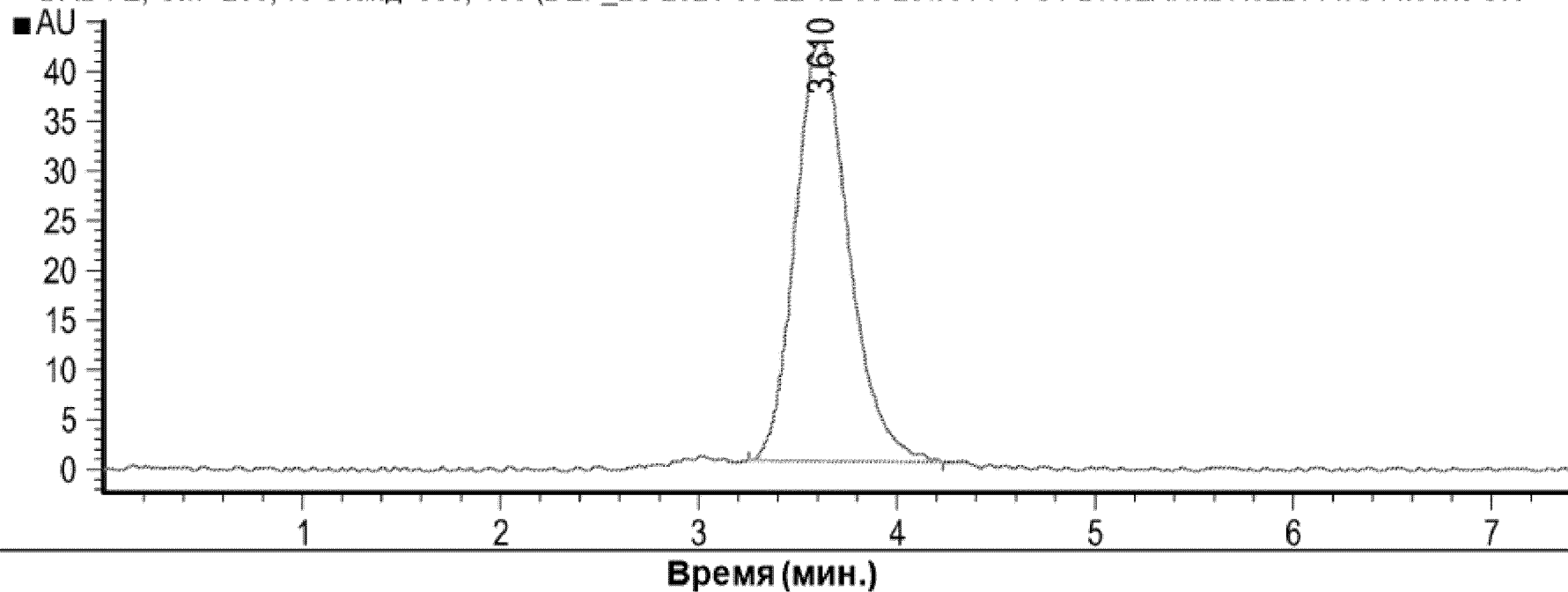
Нацеленное на дектин-1
плечо (2M24)

Нацеленное на CD20 плечо
(Ритуксимаб)



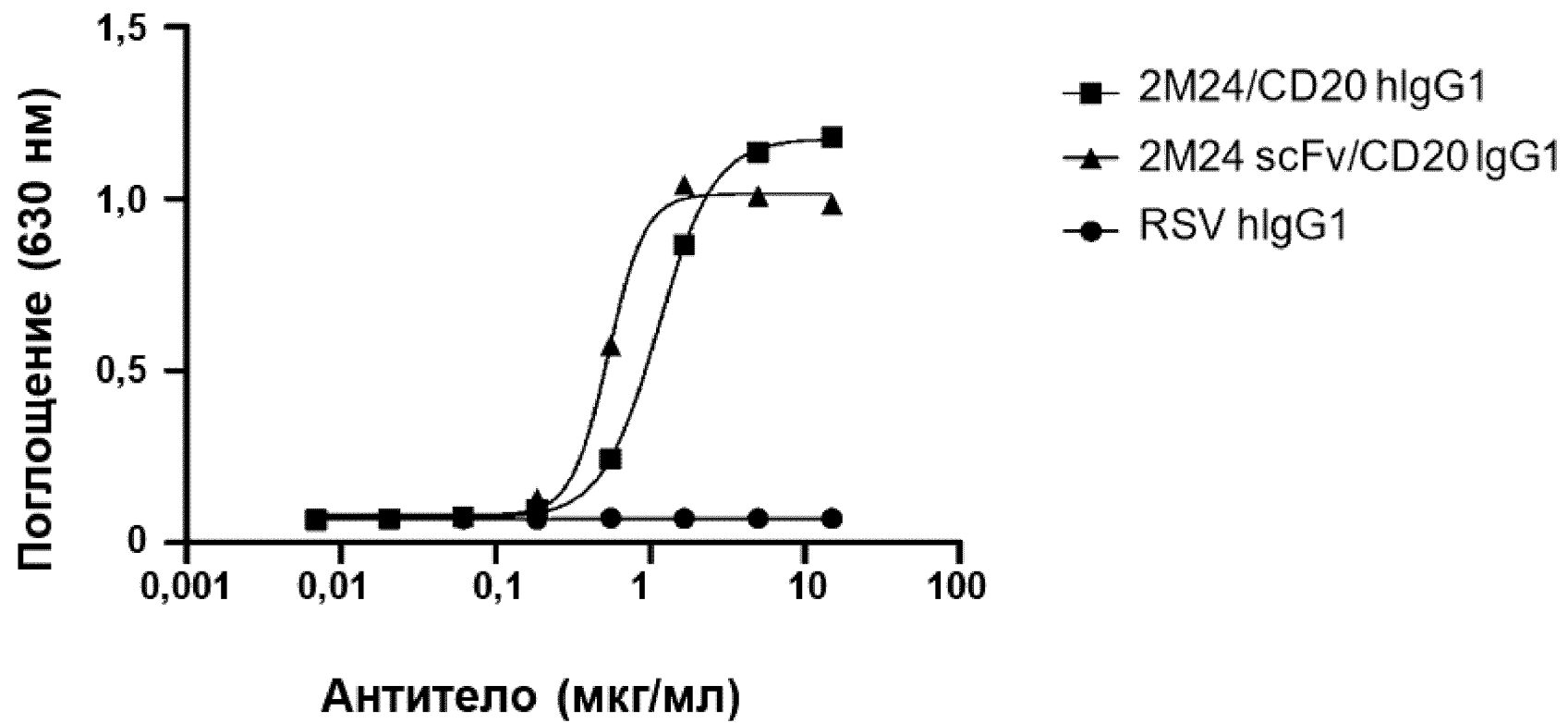
Фиг. 51

DAD1 E, Сиг=280, 16 Станд=360, 100 (DEF_LC 2021-06-22 12-36-28\001-P1-G1-DR02A.4xDR02B. 1 hG1 после ЭХ

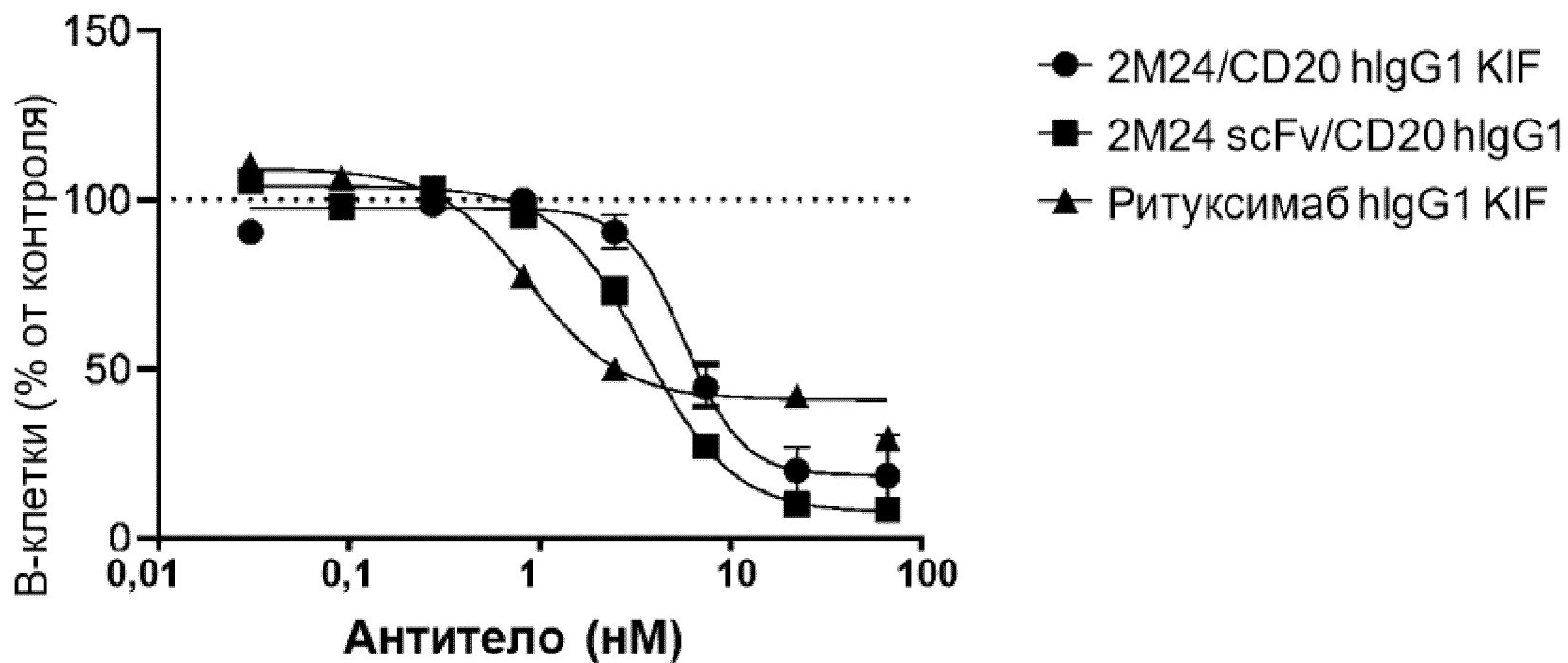


75/104

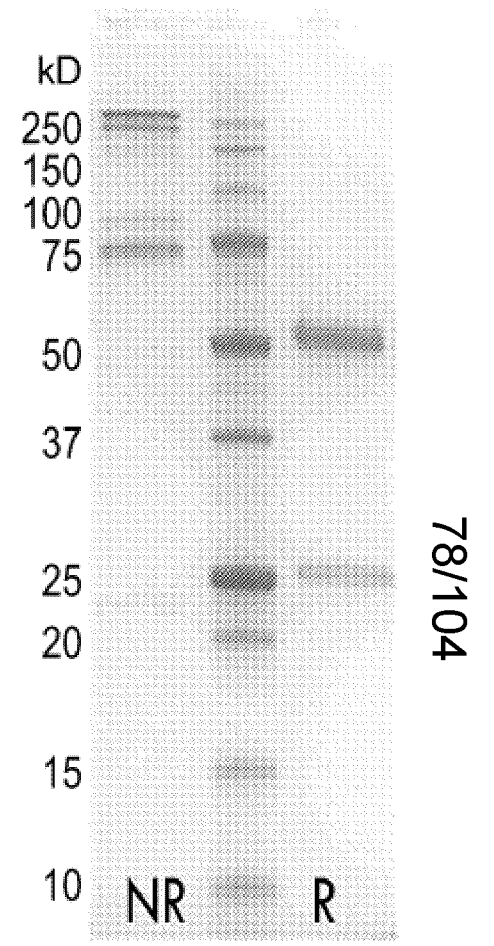
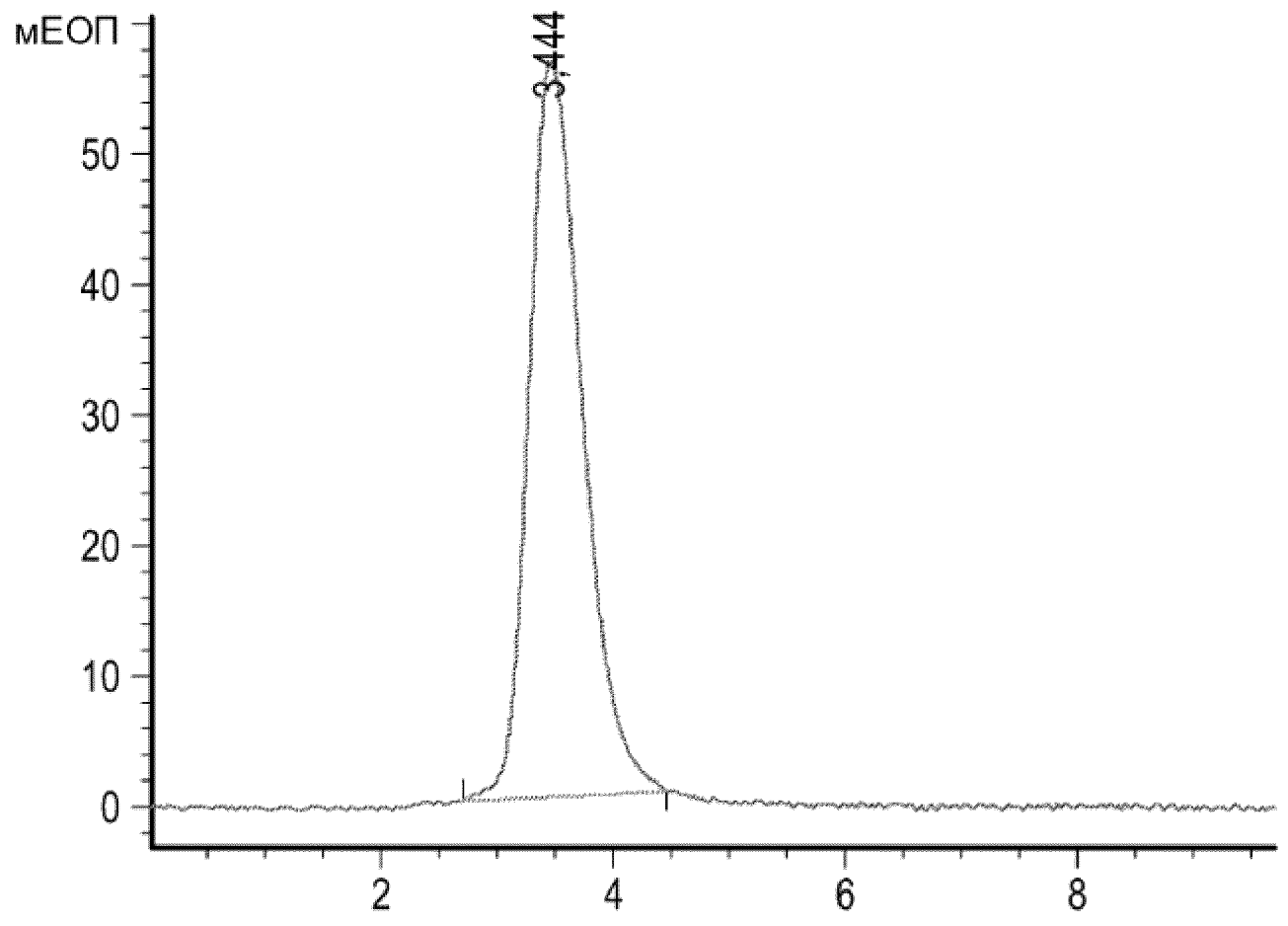
Фиг. 52А



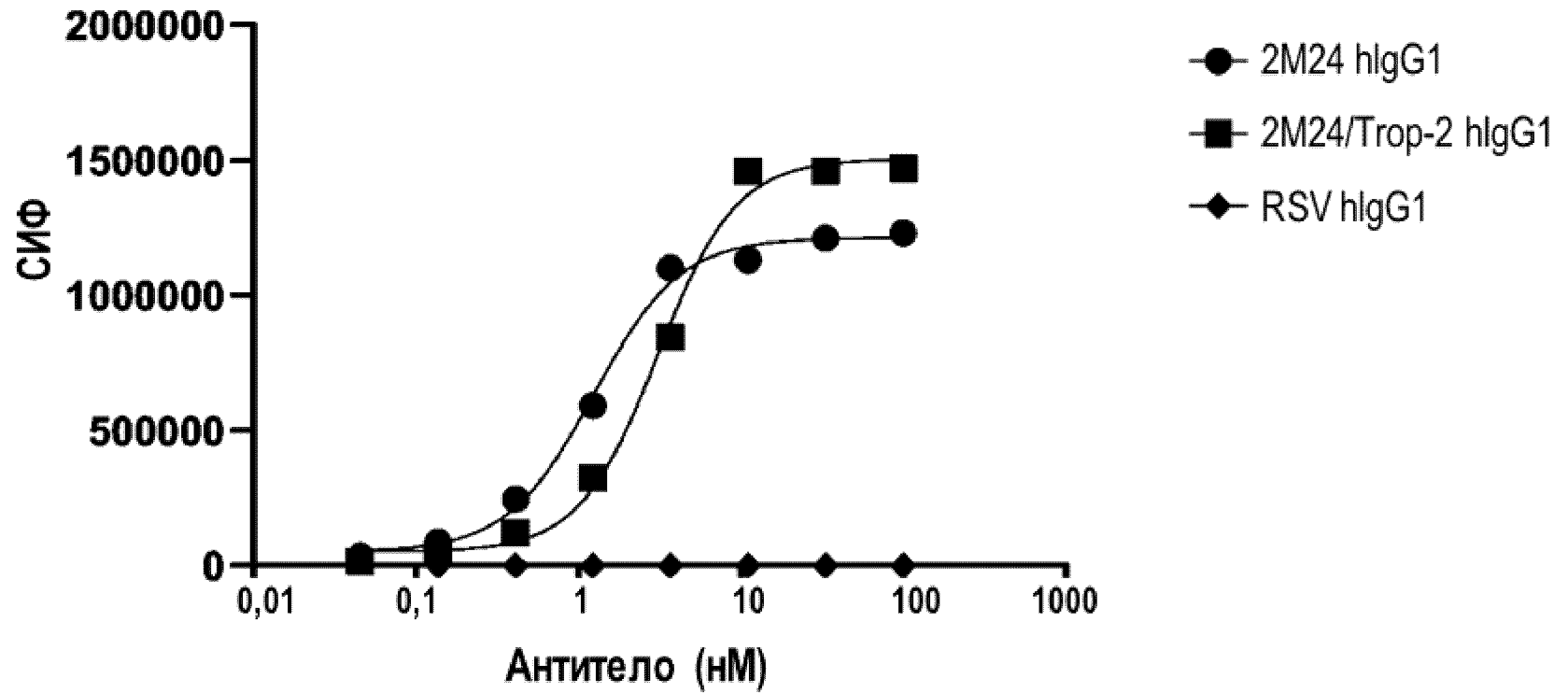
Фиг. 52В



Фиг. 52С

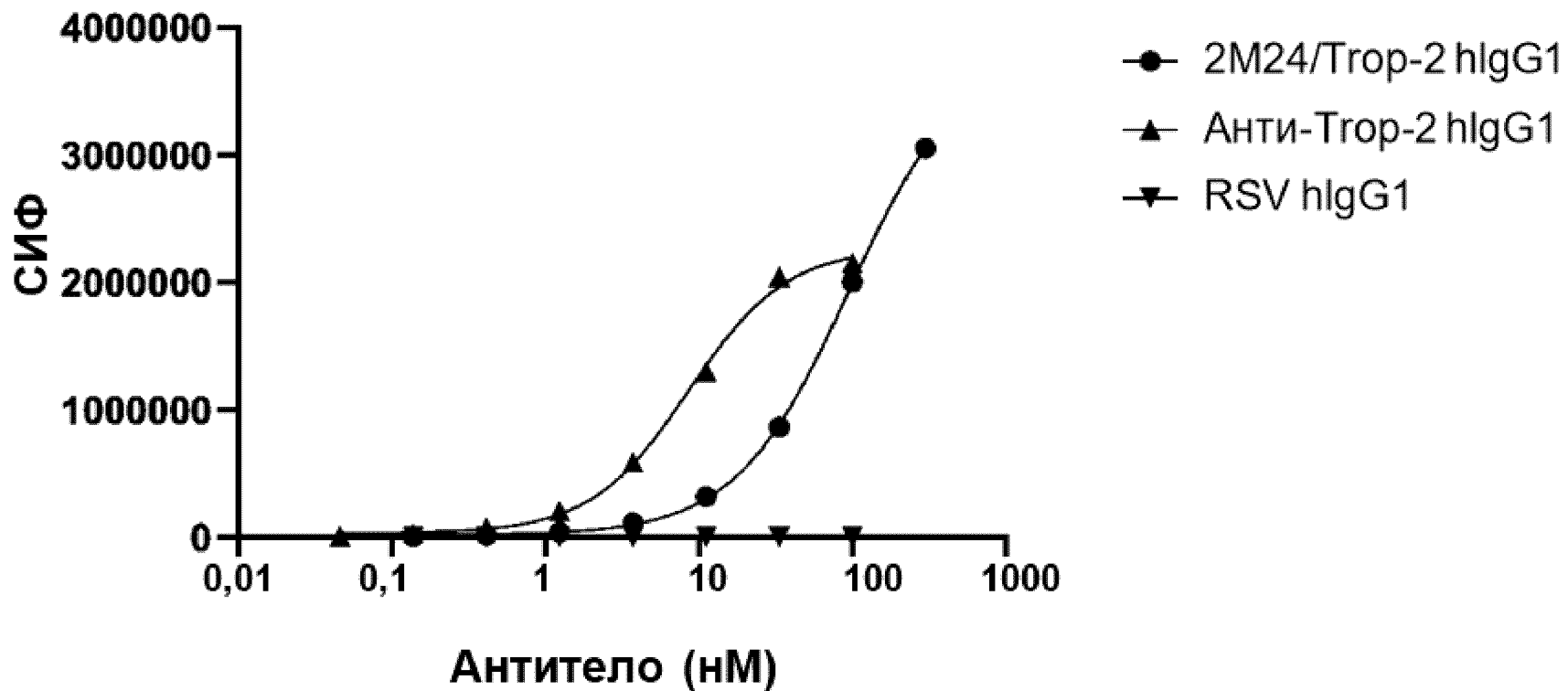


Связывание с клетками НЕК, экспрессирующими дектин-1

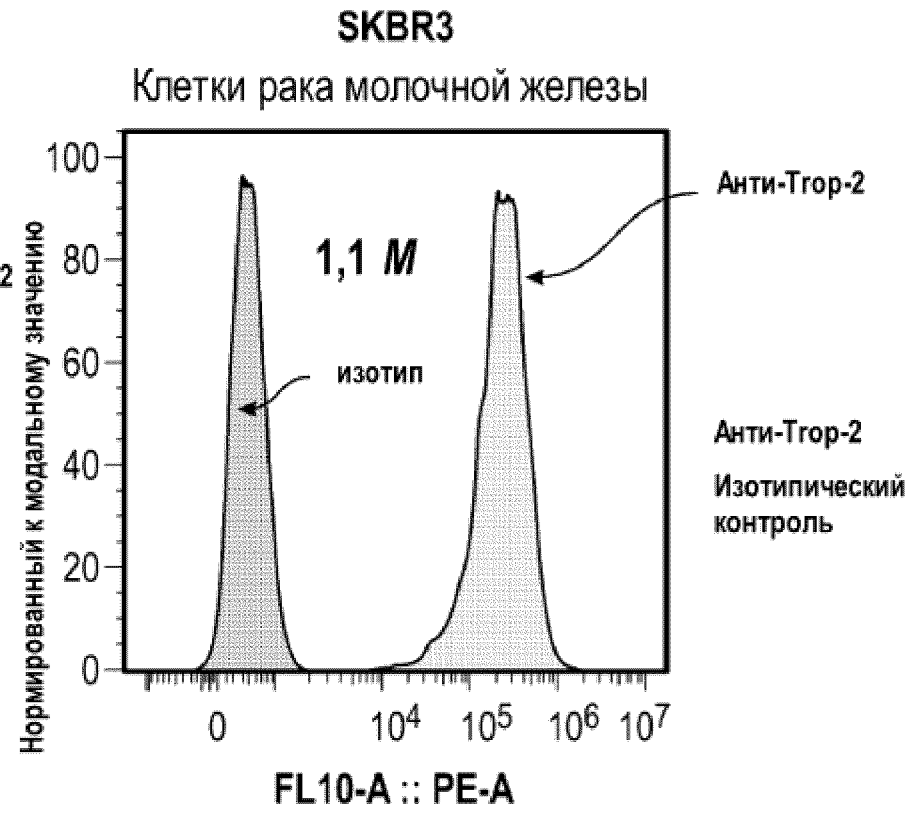
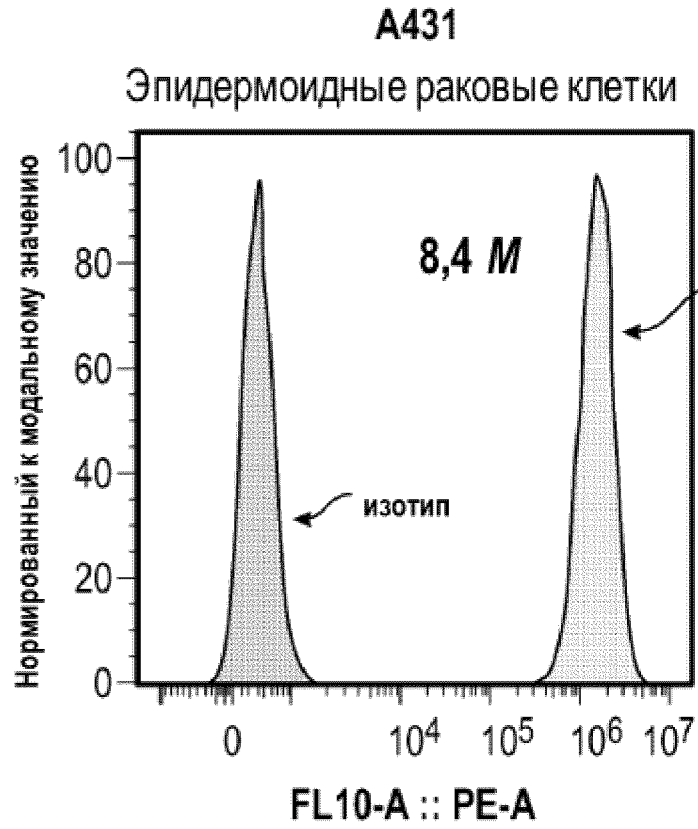


Фиг. 53В

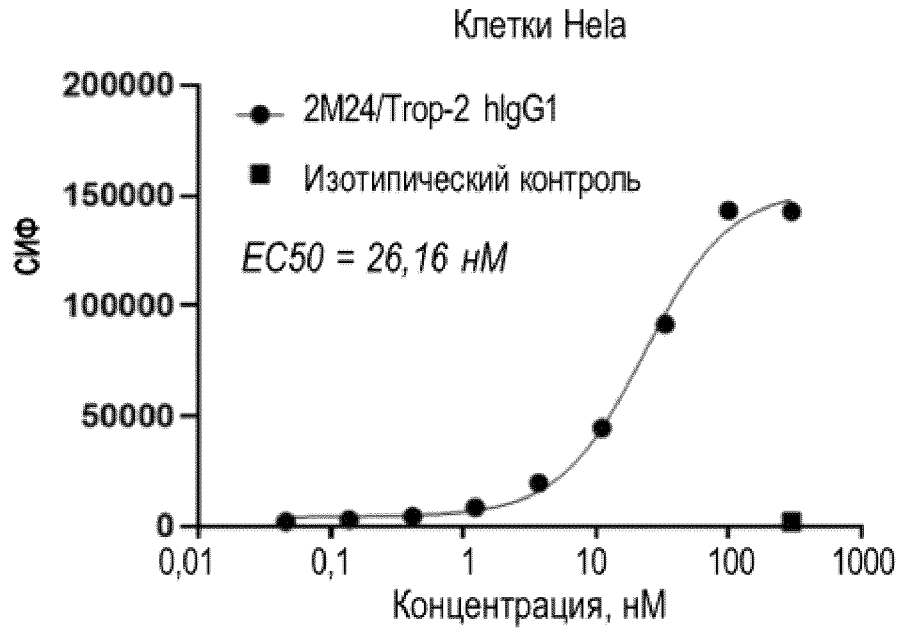
Связывание с клетками А431



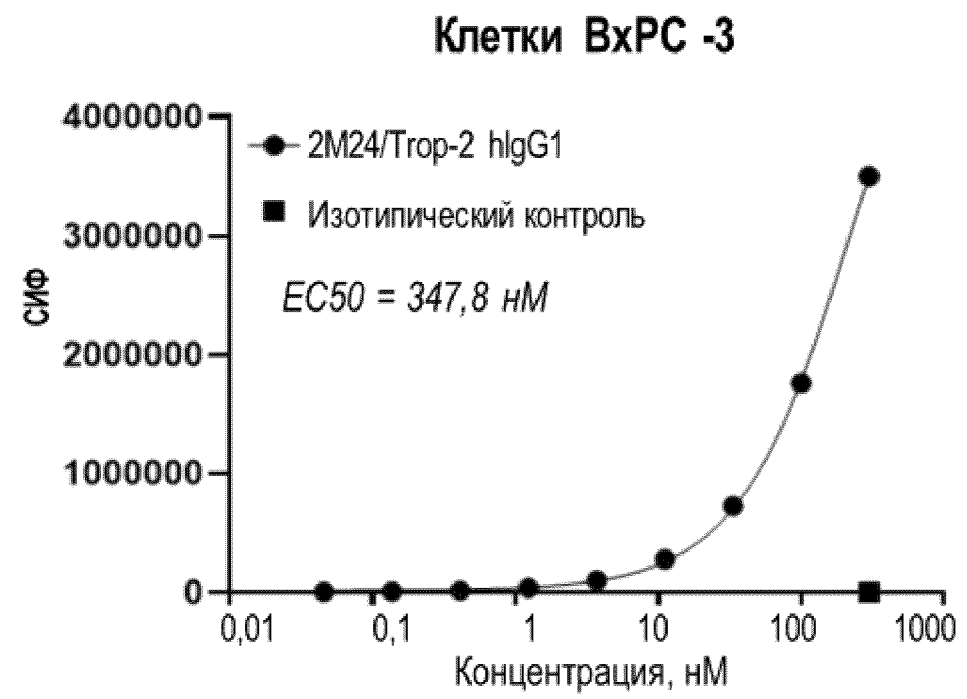
Фиг. 53С



Фиг. 54

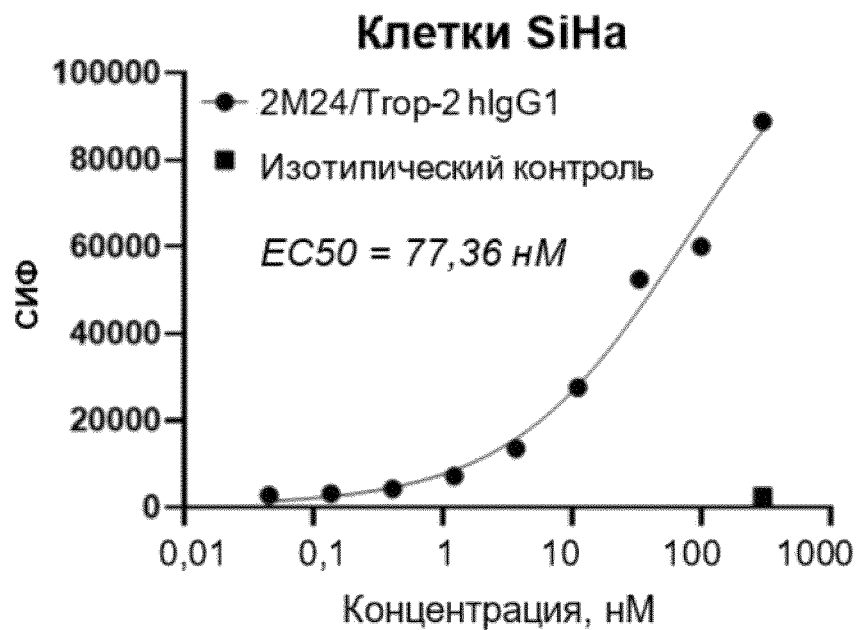


Фиг. 55А

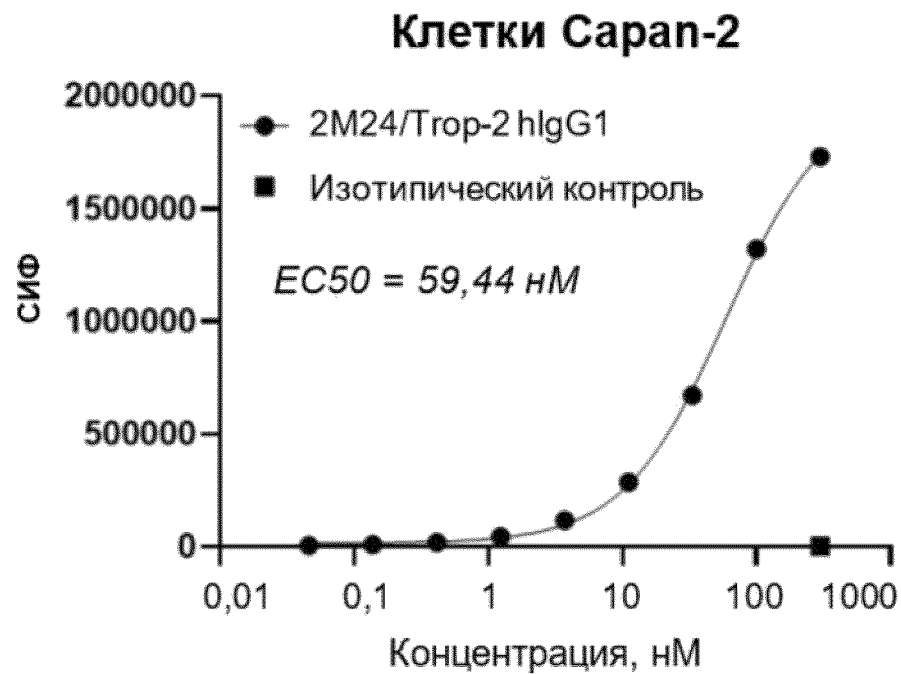


Фиг. 55В

82/104

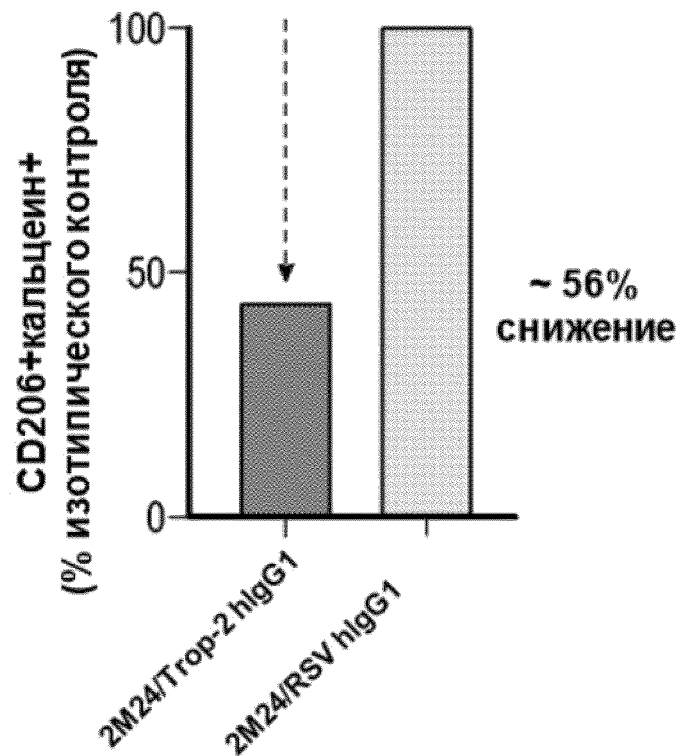
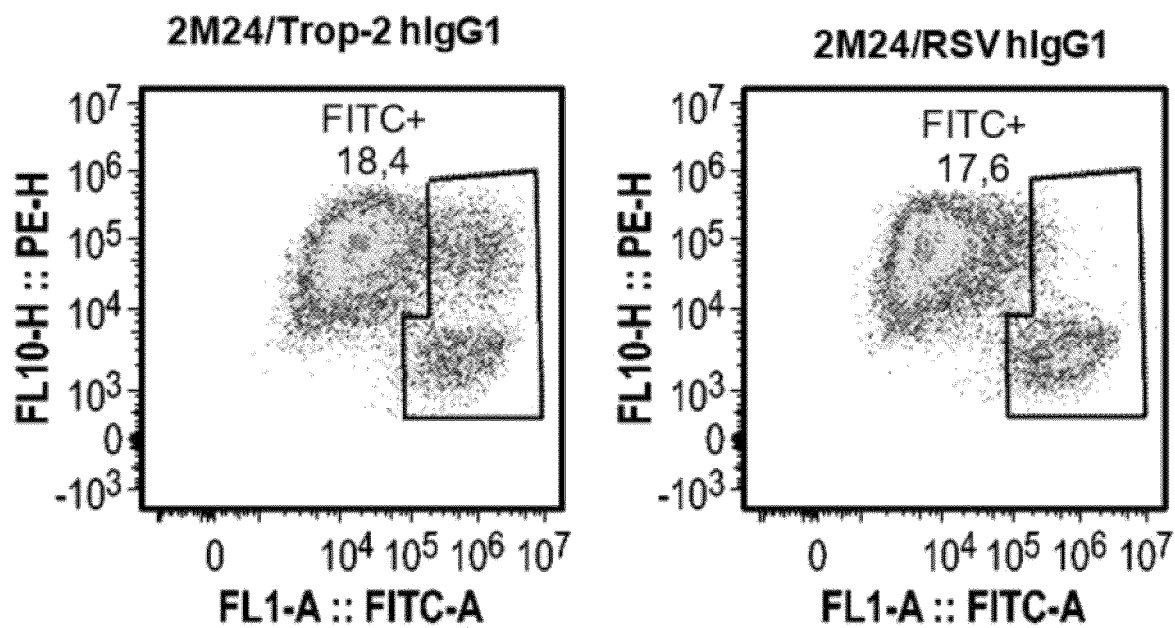


Фиг. 55С



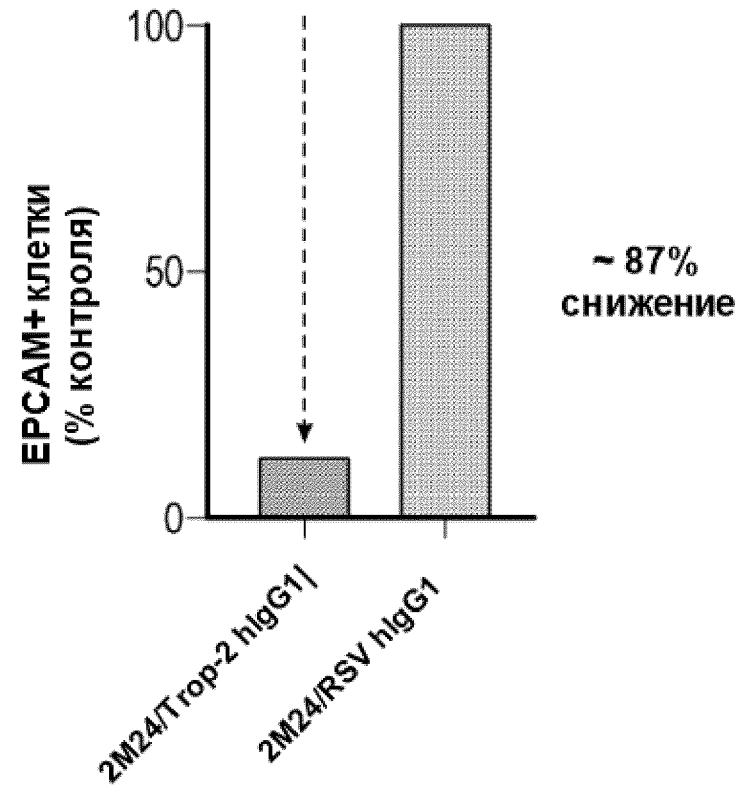
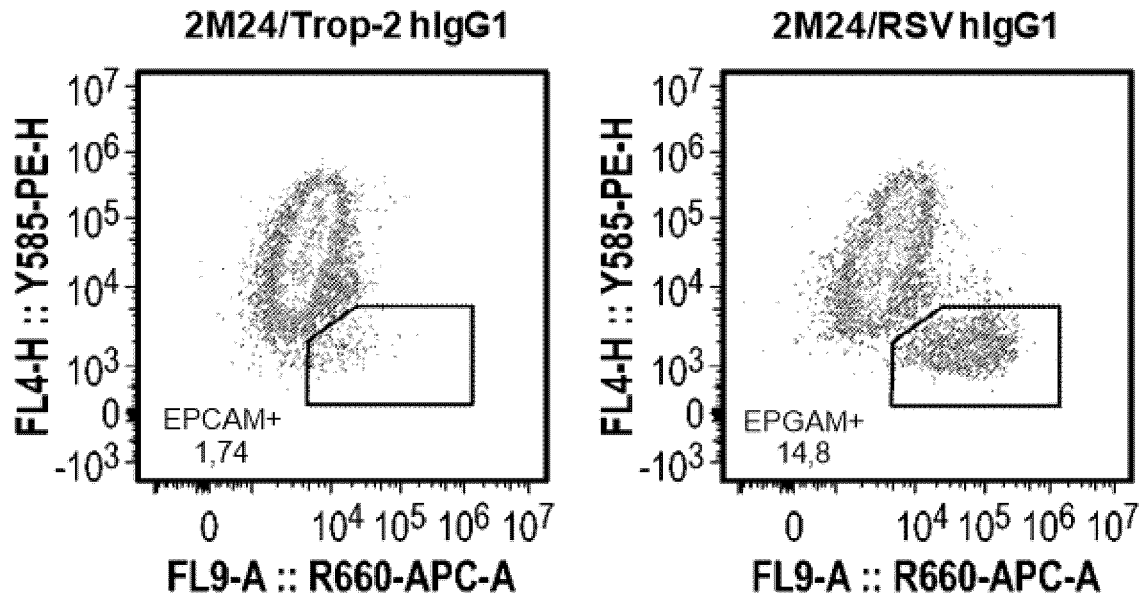
Фиг. 55D

Макрофаги и клетки SKBR3

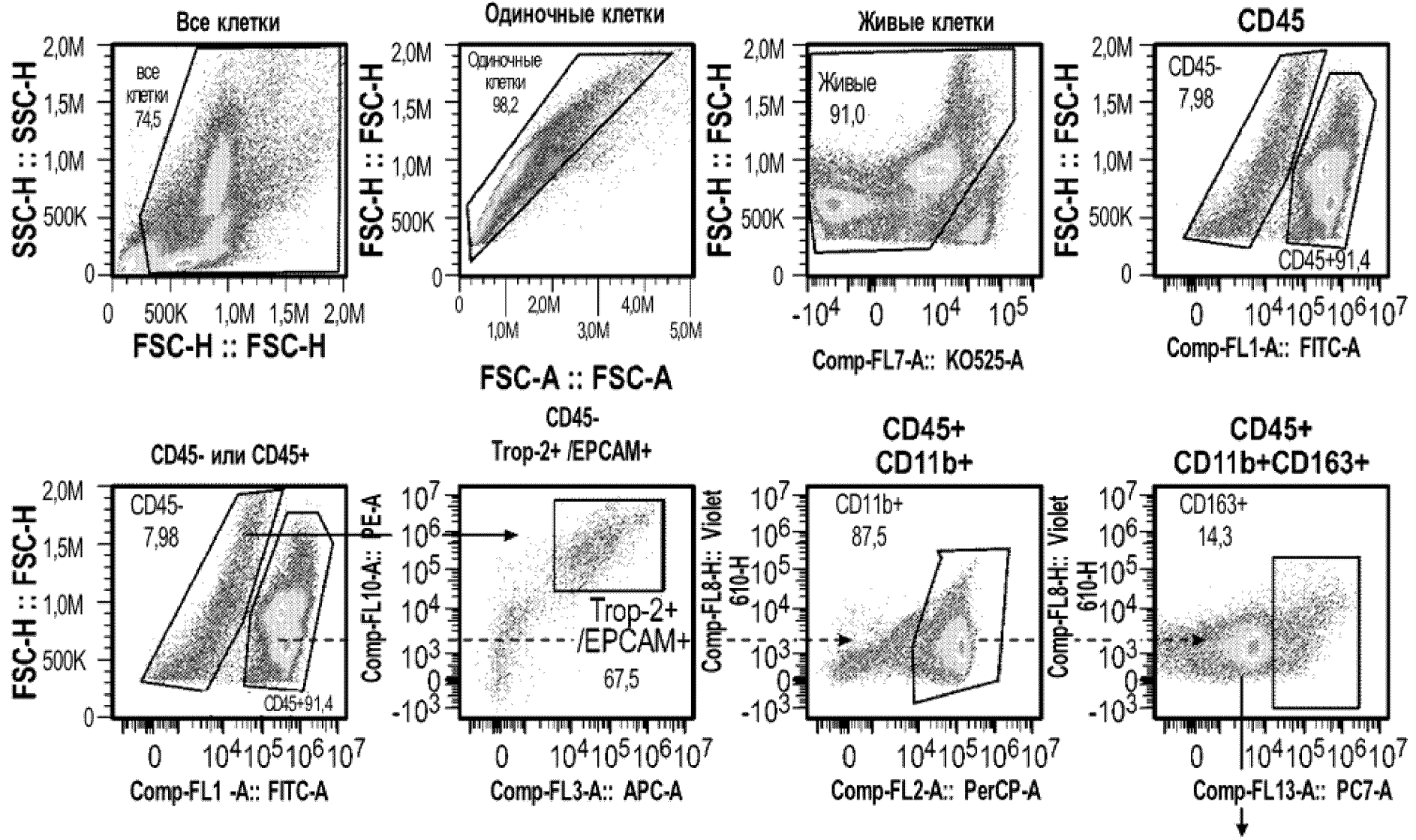


Фиг. 56А

Макрофаги и клетки A431

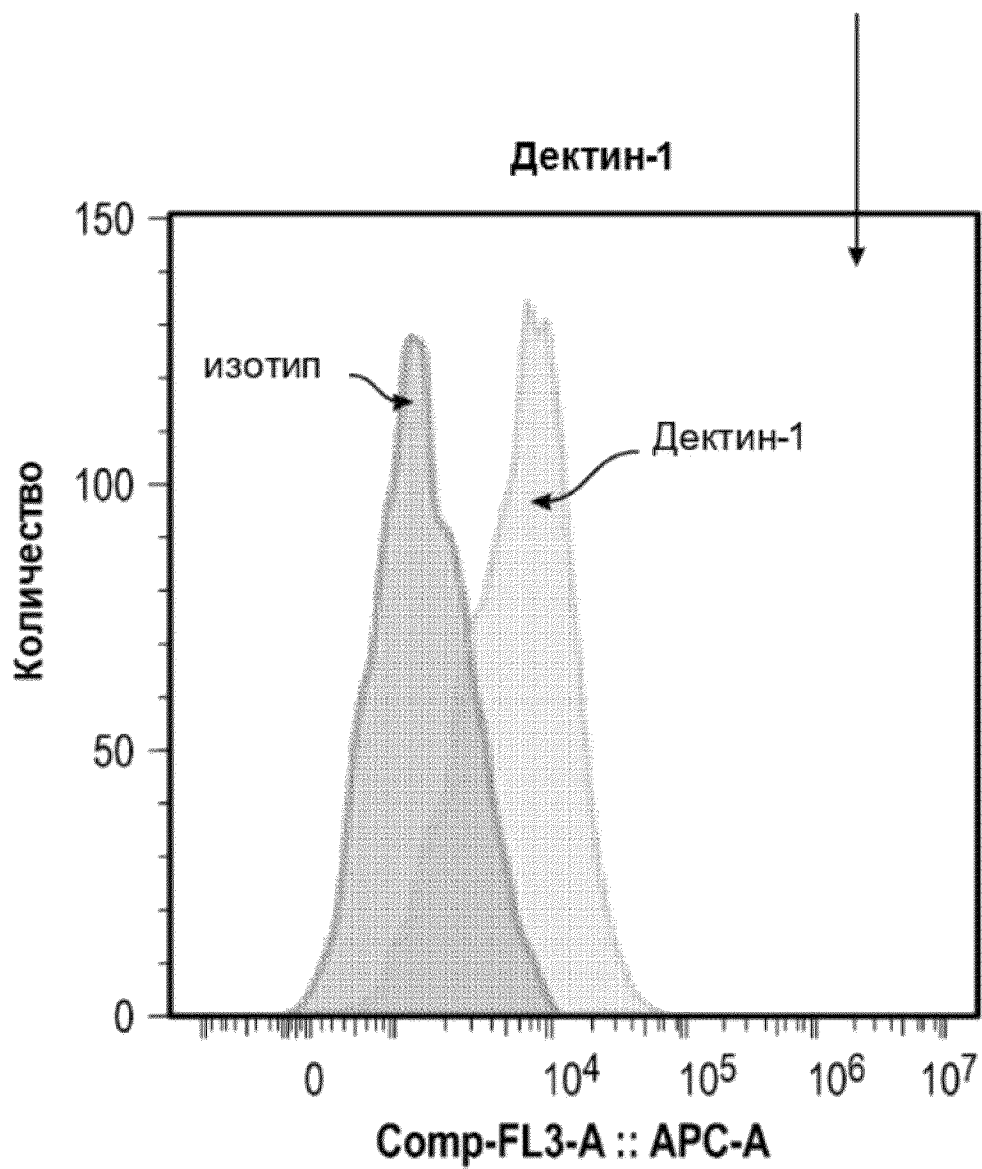


Фиг. 56В

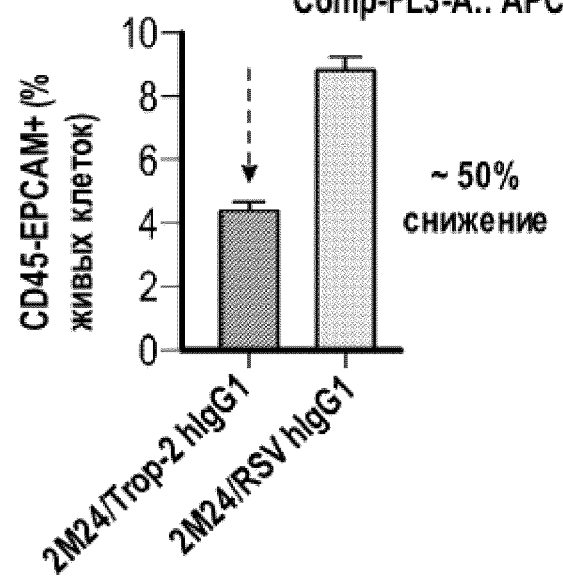
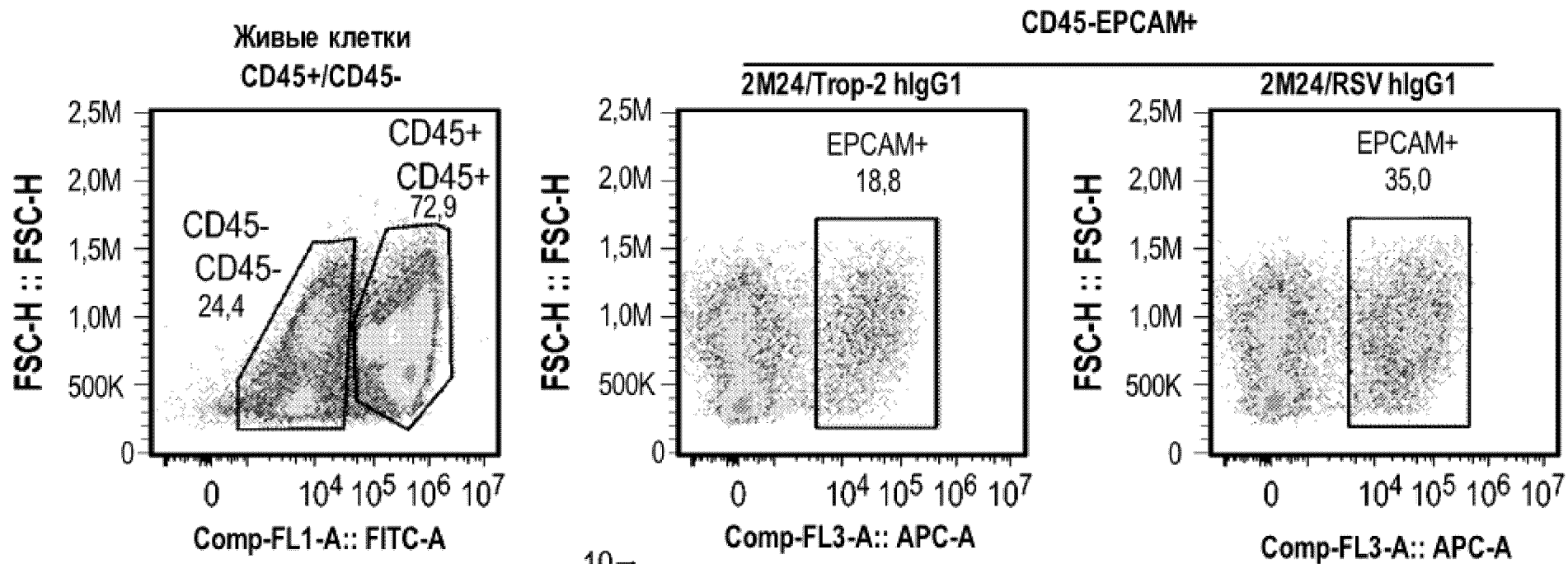


Фиг. 57А

87/104



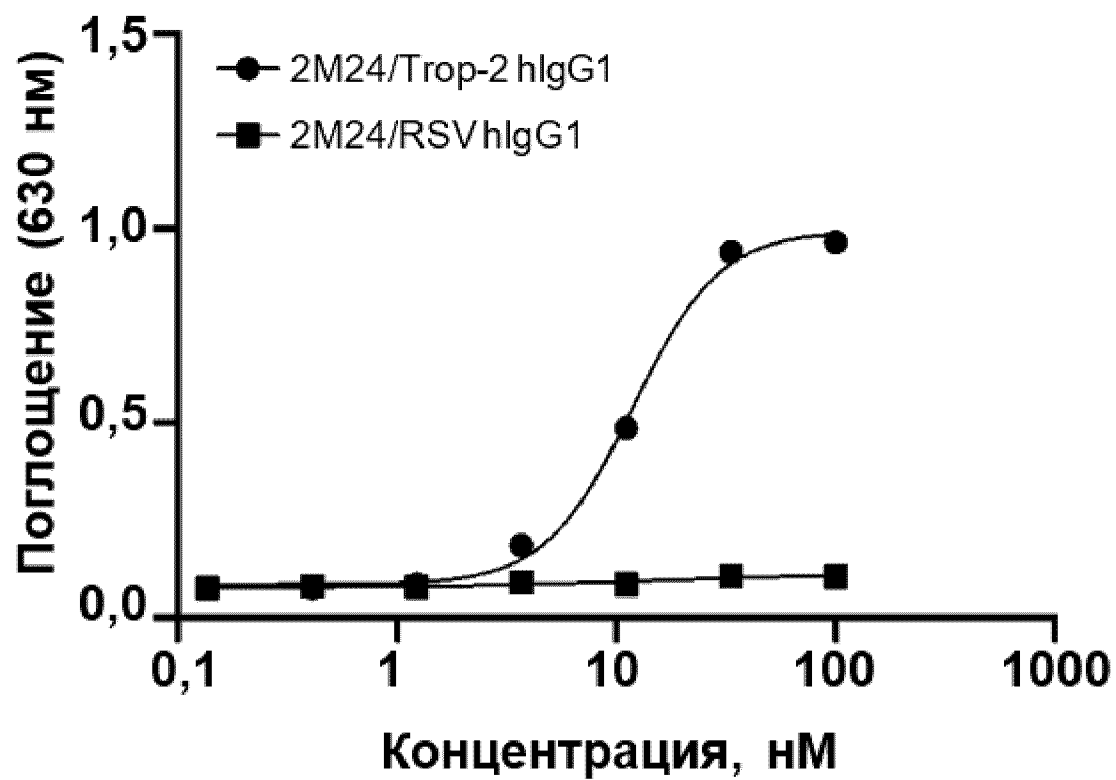
Фиг. 57В



88/104

Фиг. 58

89/104

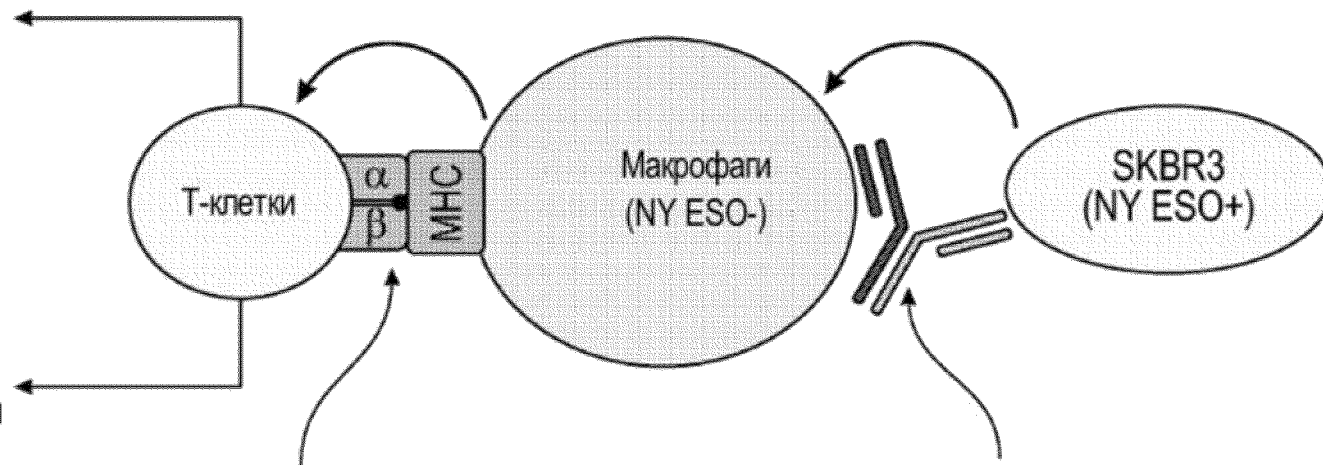


Фиг. 59А

**Результаты
анализа:**

Цитокины

Маркеры
ранней активации

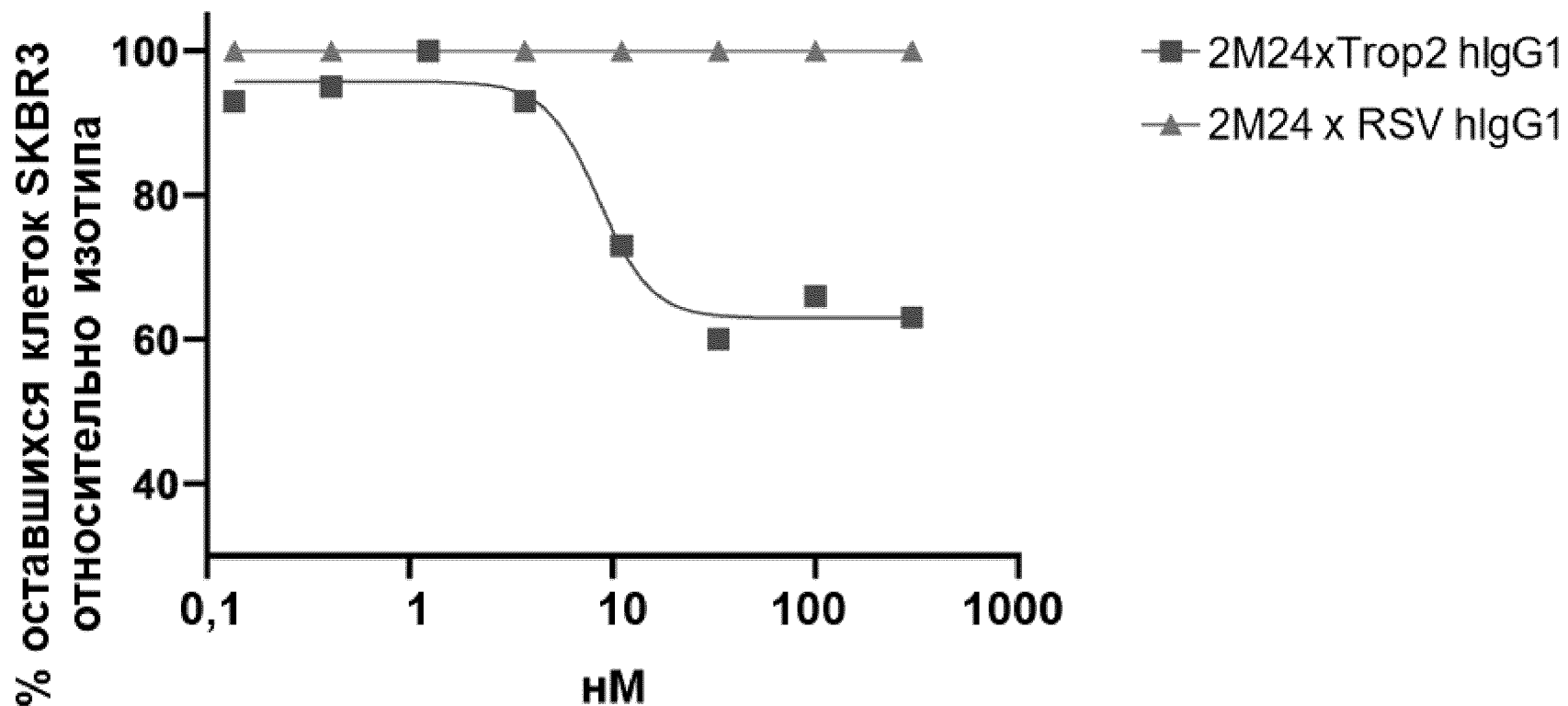


Пептид NY ESO презентирован на
MHC, распознаемом антиген-
специфическими Т-клетками

Биспецифическое Ат 2M24/Trop-2 hlgG1
индуцируют фагоцитоз
клеток SKBR3, экспрессирующих антиген NY ESO

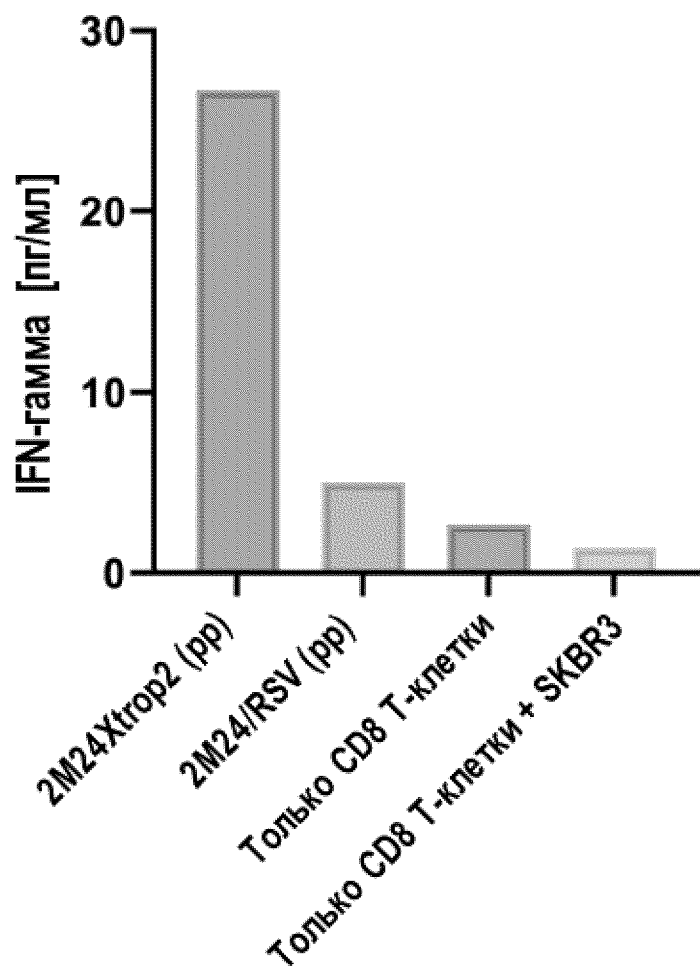
Фиг. 59В

StemCell HD1004 MO + SKBR3
(96-лучочный полипропиленовый)



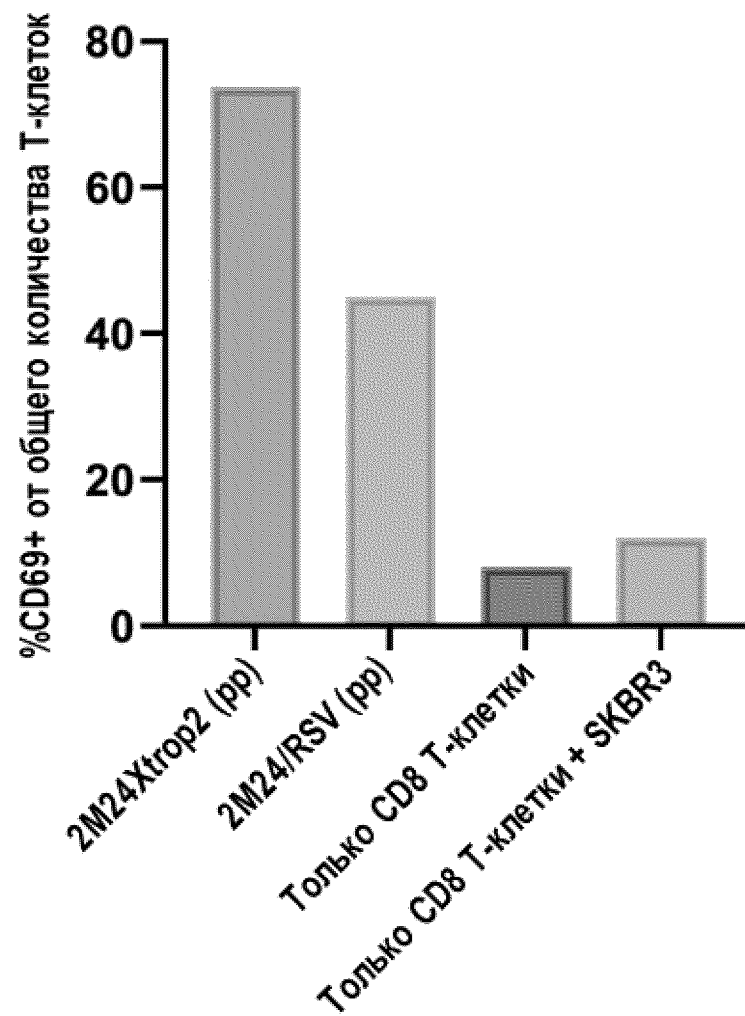
Фиг. 59С

Набор BD OptiEIA
MO/SKBR3/CD8+T [4:1:5]



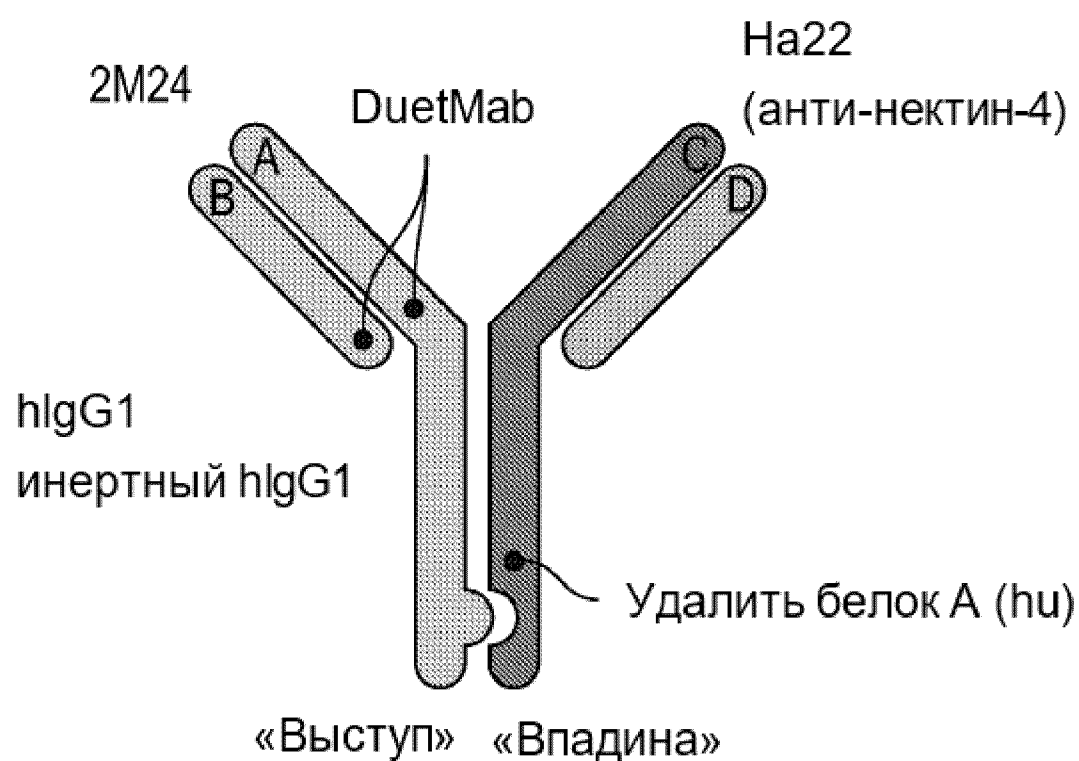
Фиг. 59D

CD3+ CD69+

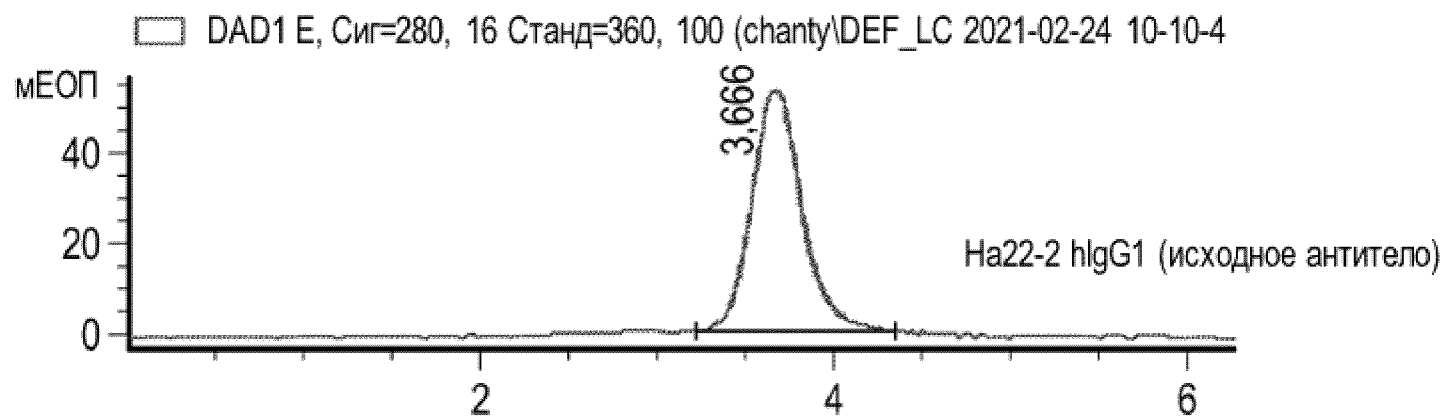


Фиг. 59E

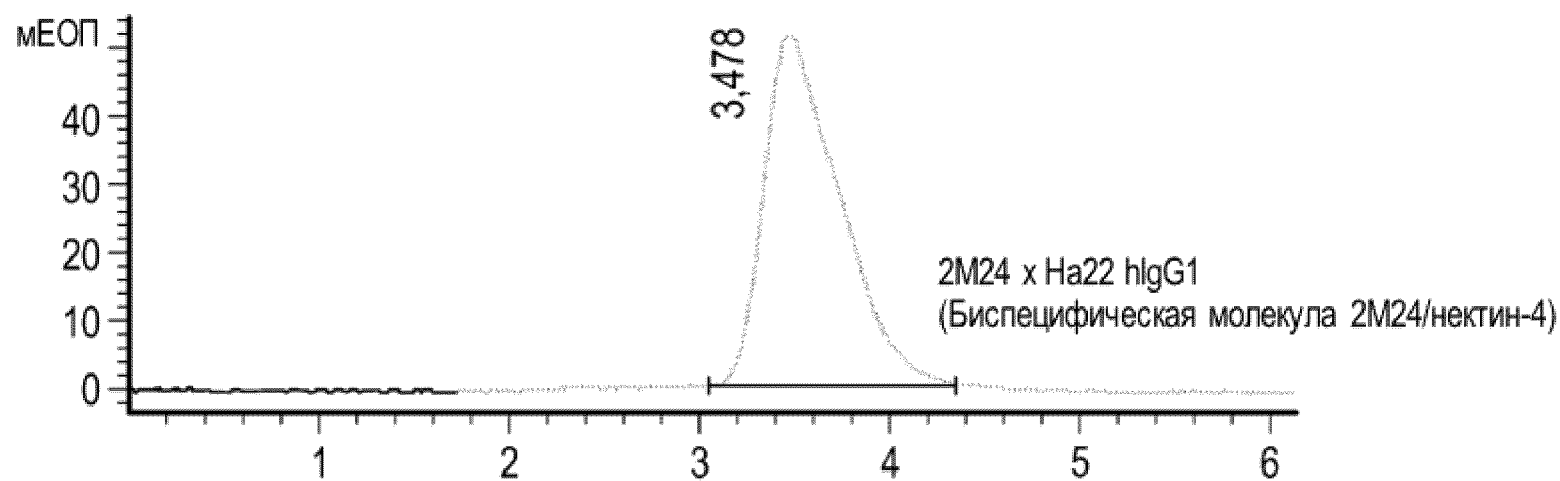
92/104



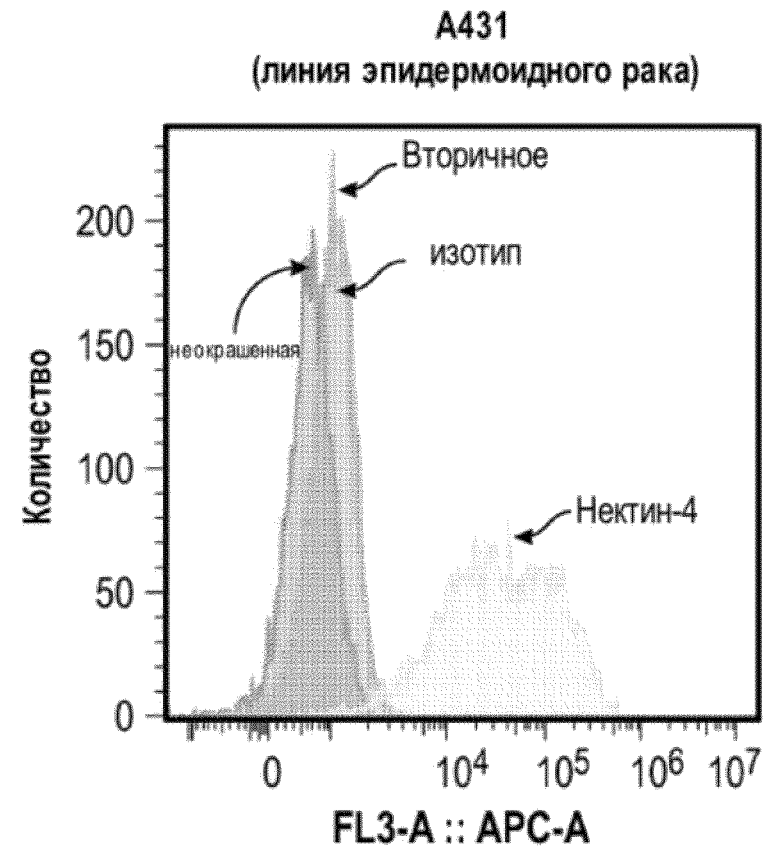
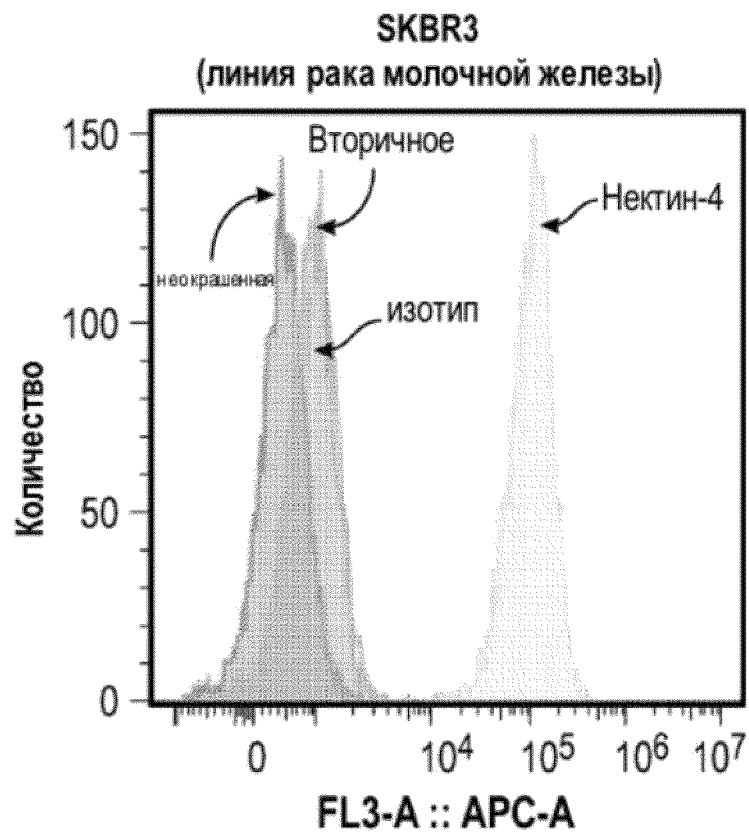
Фиг. 60А



DAD1 E, Сиг=280,16 Станд=360,100 (004-P2-A2-349.D)

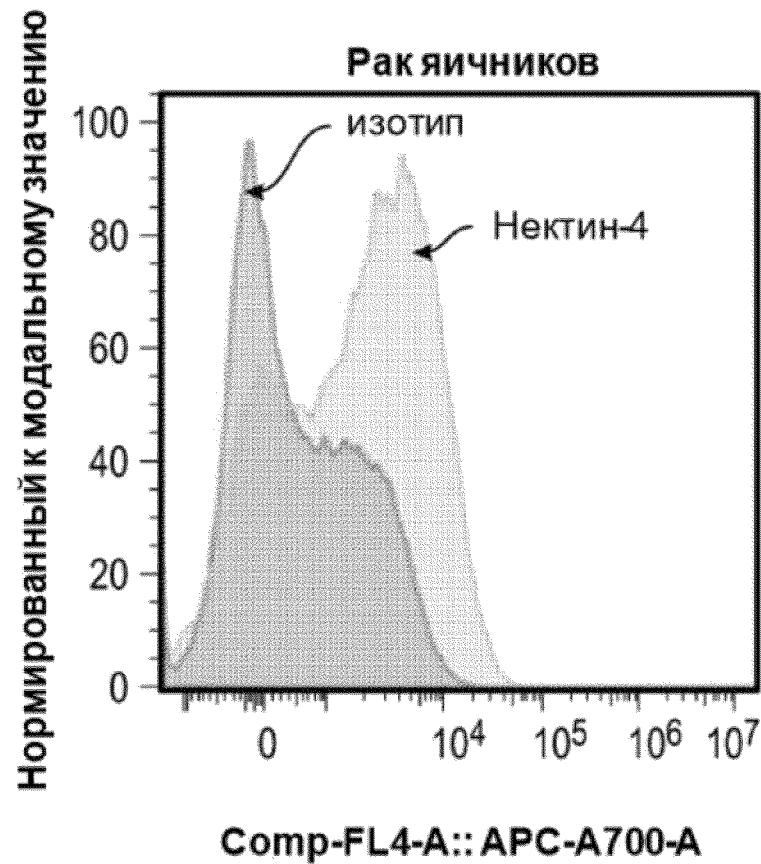
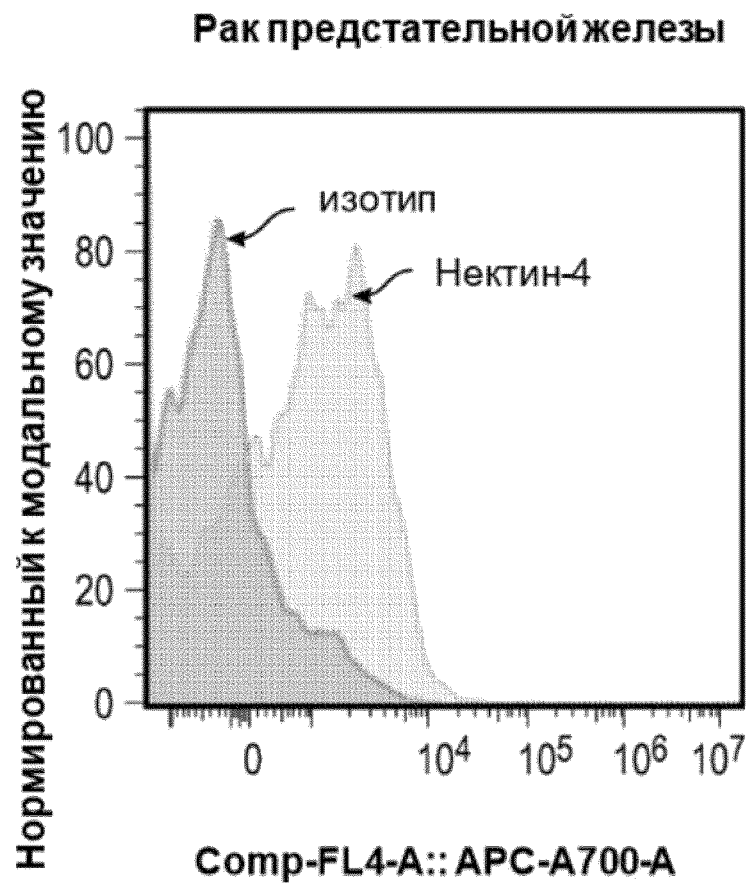


Фиг. 60В



Фиг. 61А

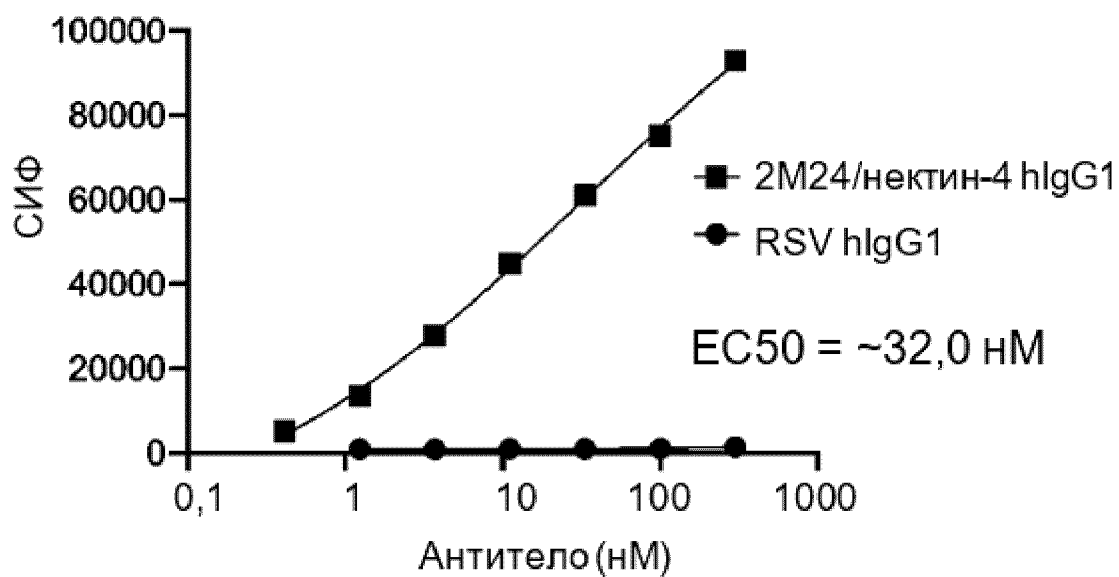
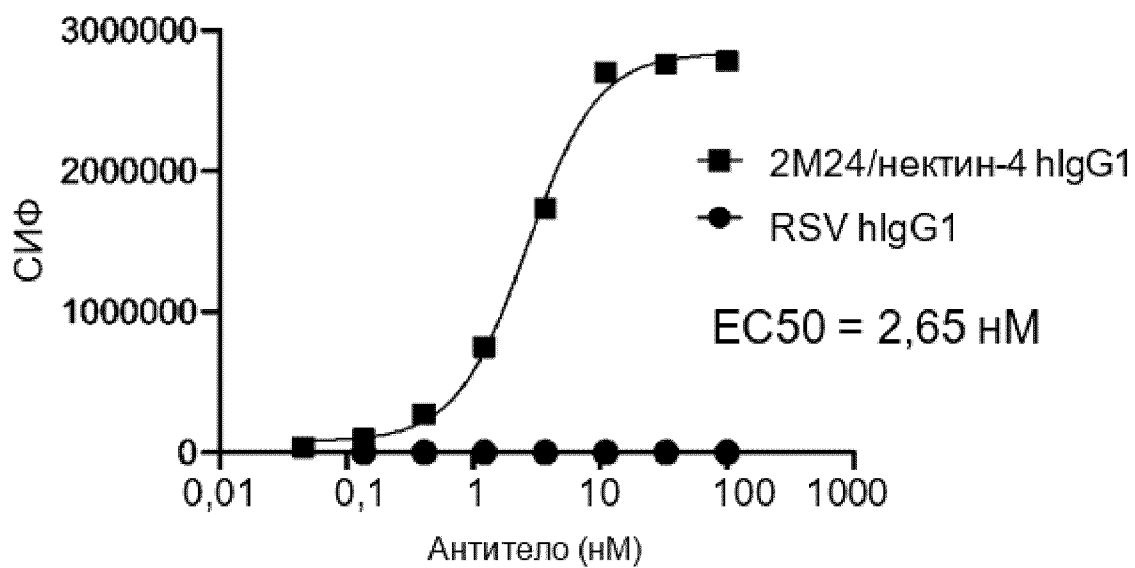
95/104



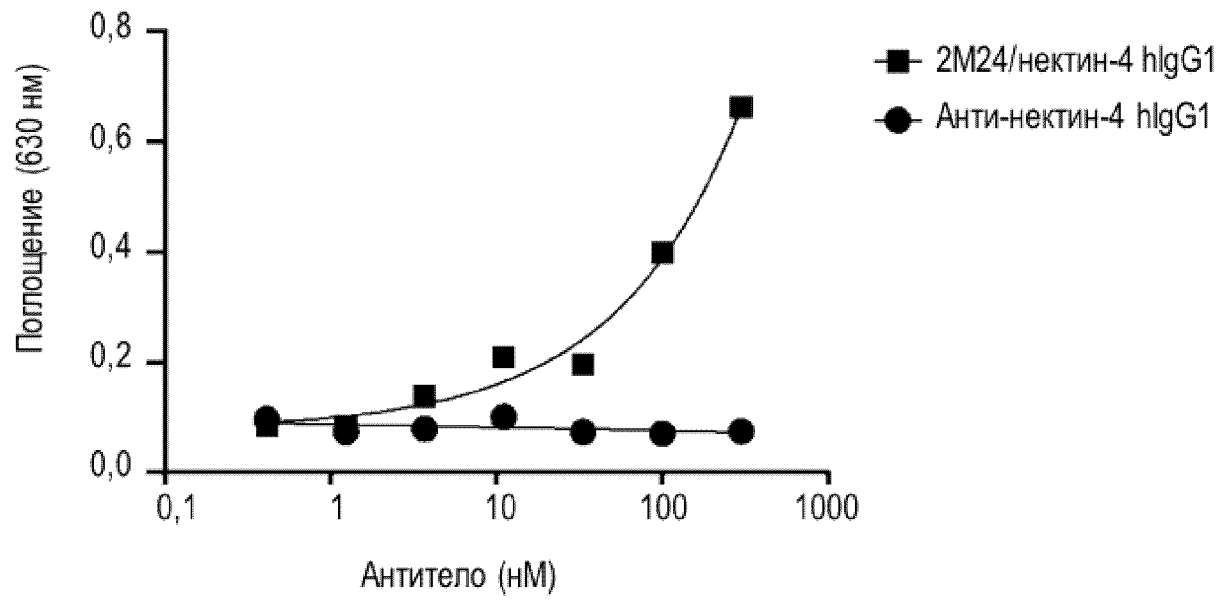
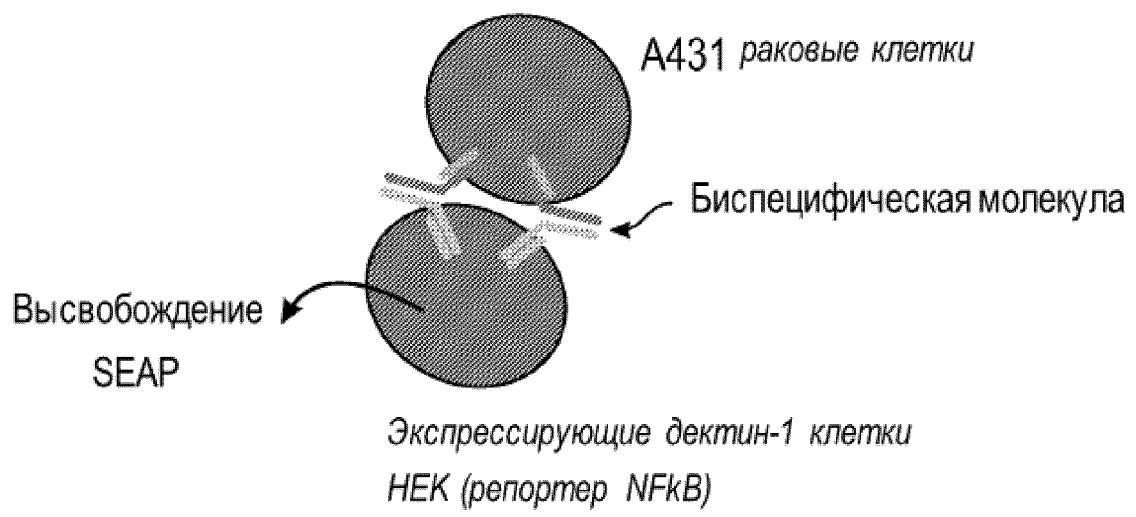
96/104

Фиг. 61В

97/104

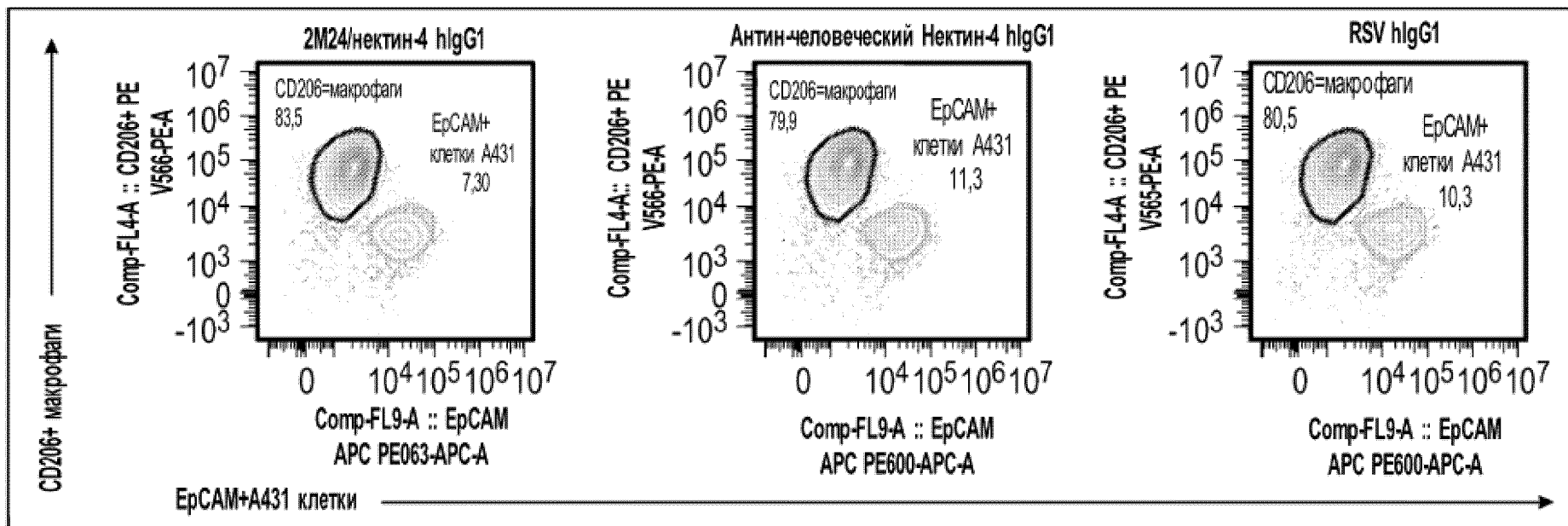
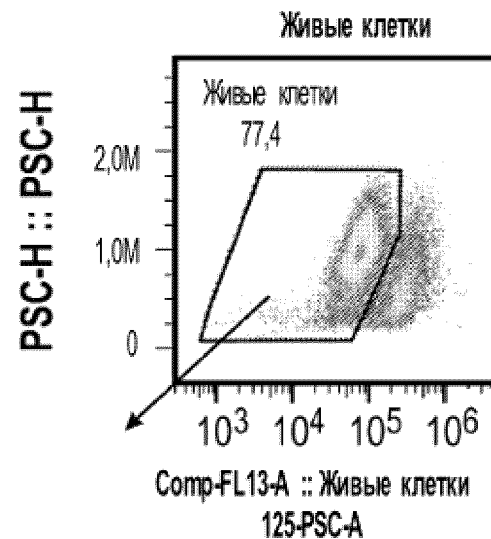
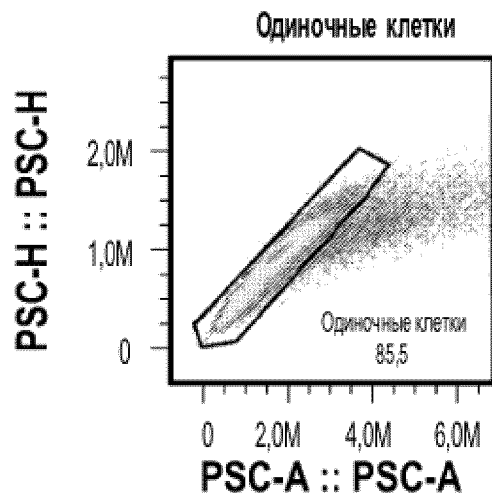
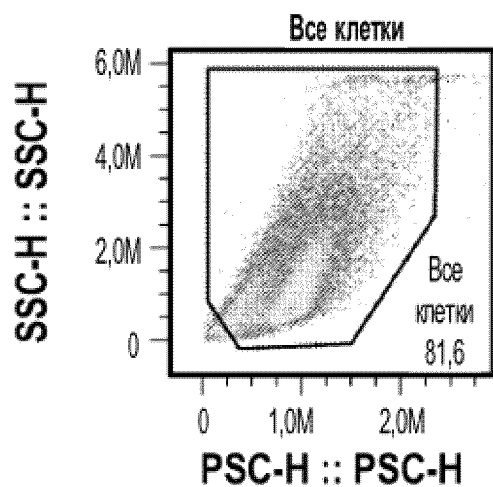


Фиг. 62

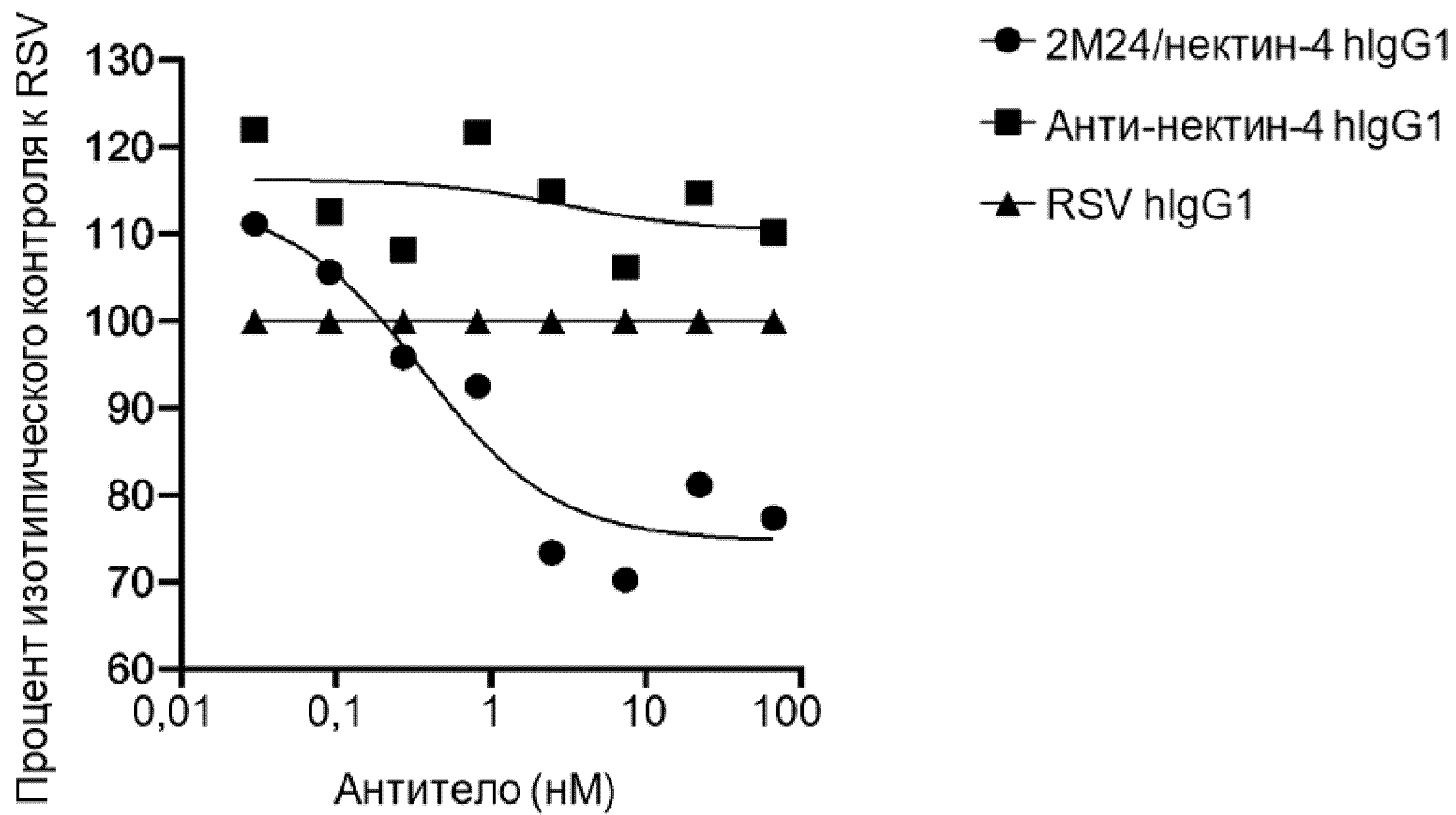


98/104

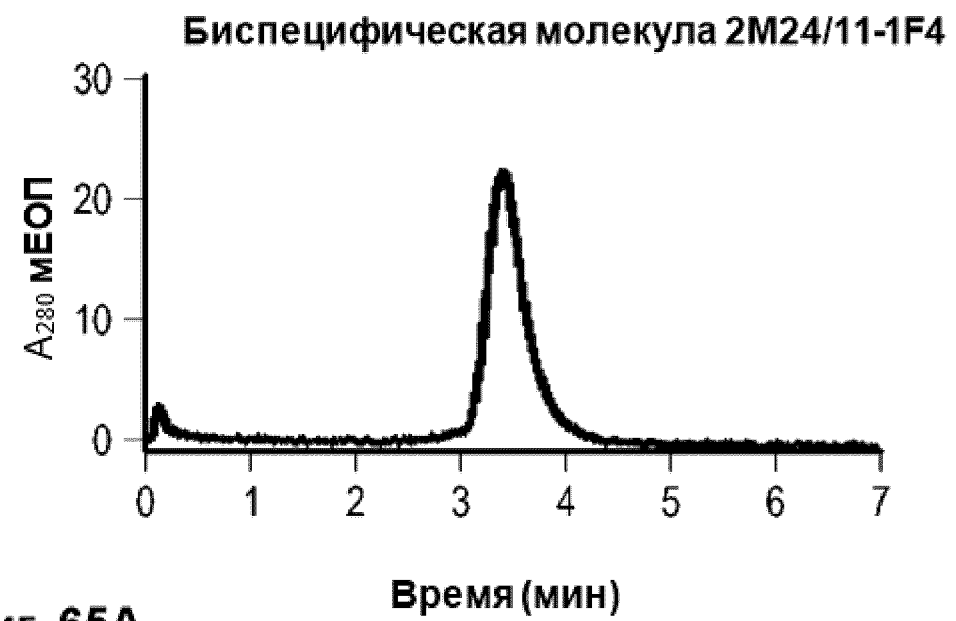
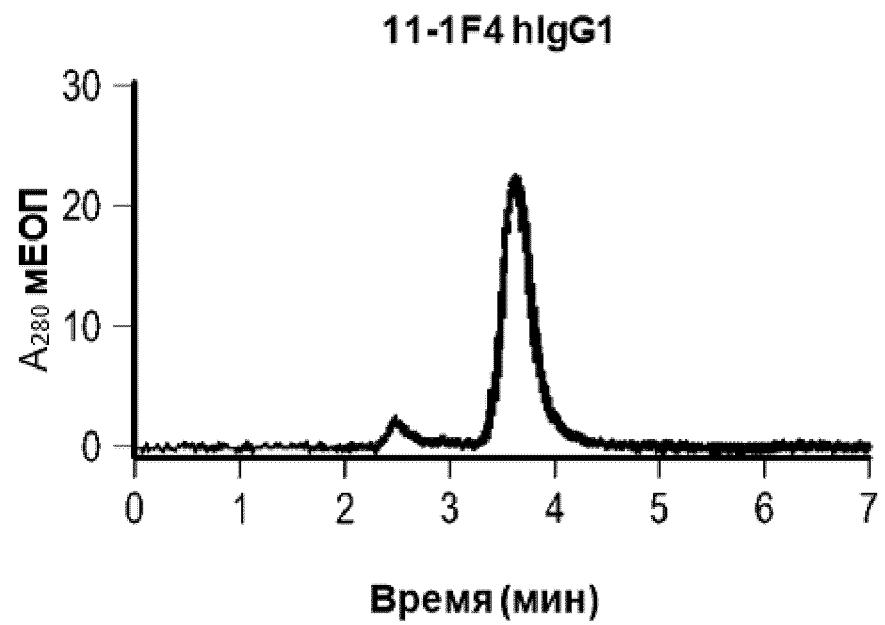
Фиг. 63



Фиг. 64А



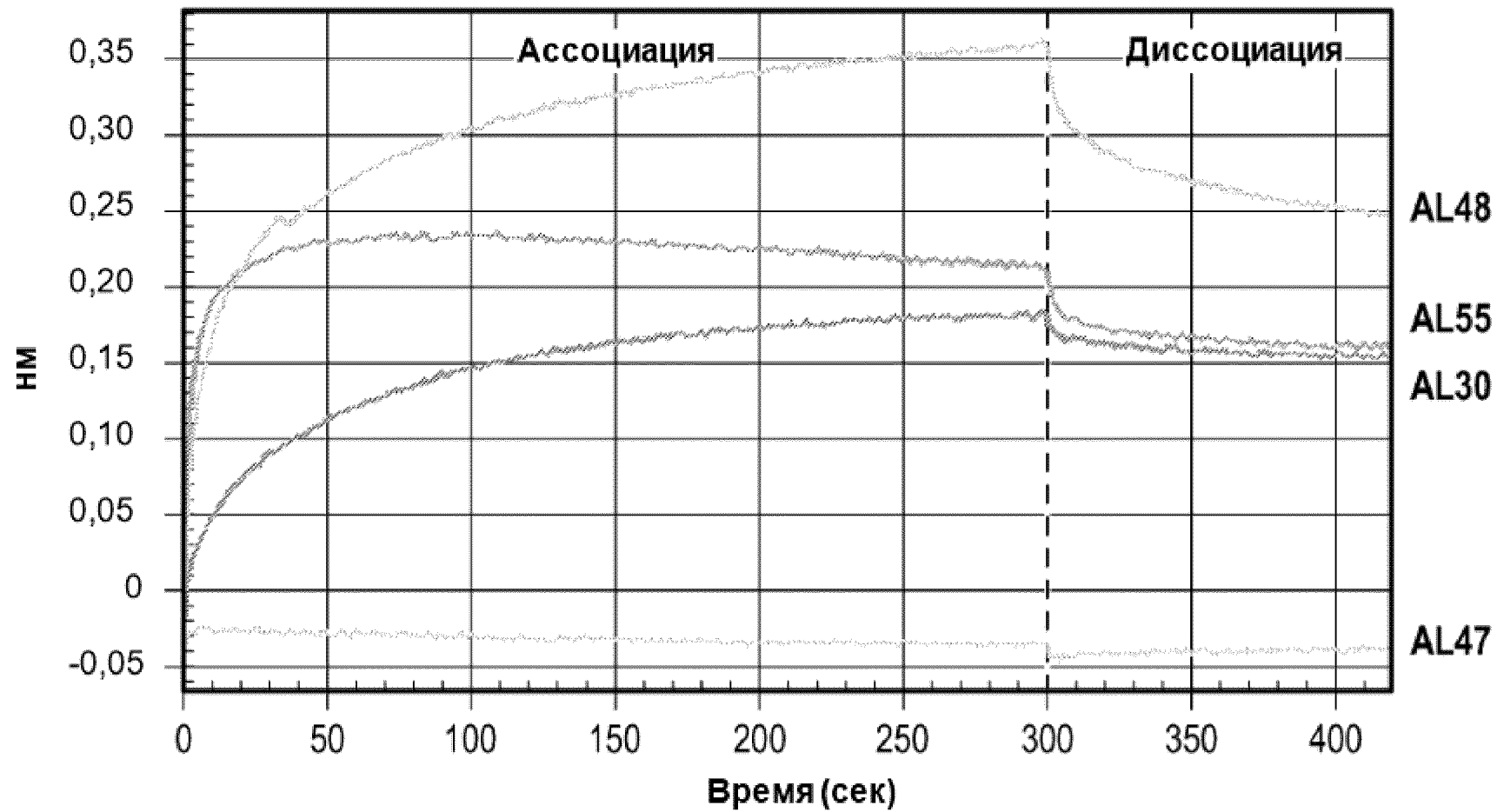
Фиг. 64В



Фиг. 65А

101/104

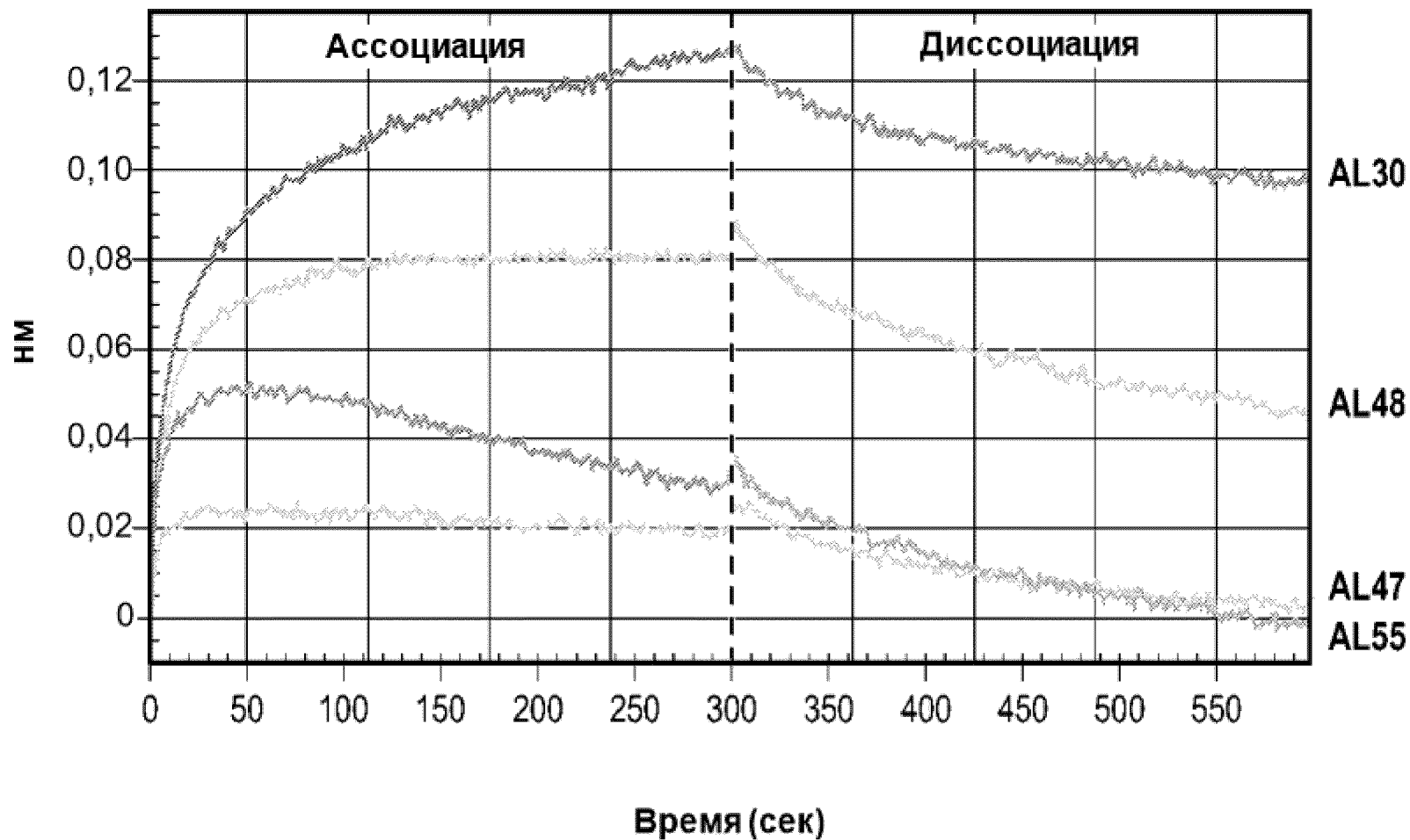
Связывание 11-1F4 hG1 с амилоидами



102/104

Фиг. 65В

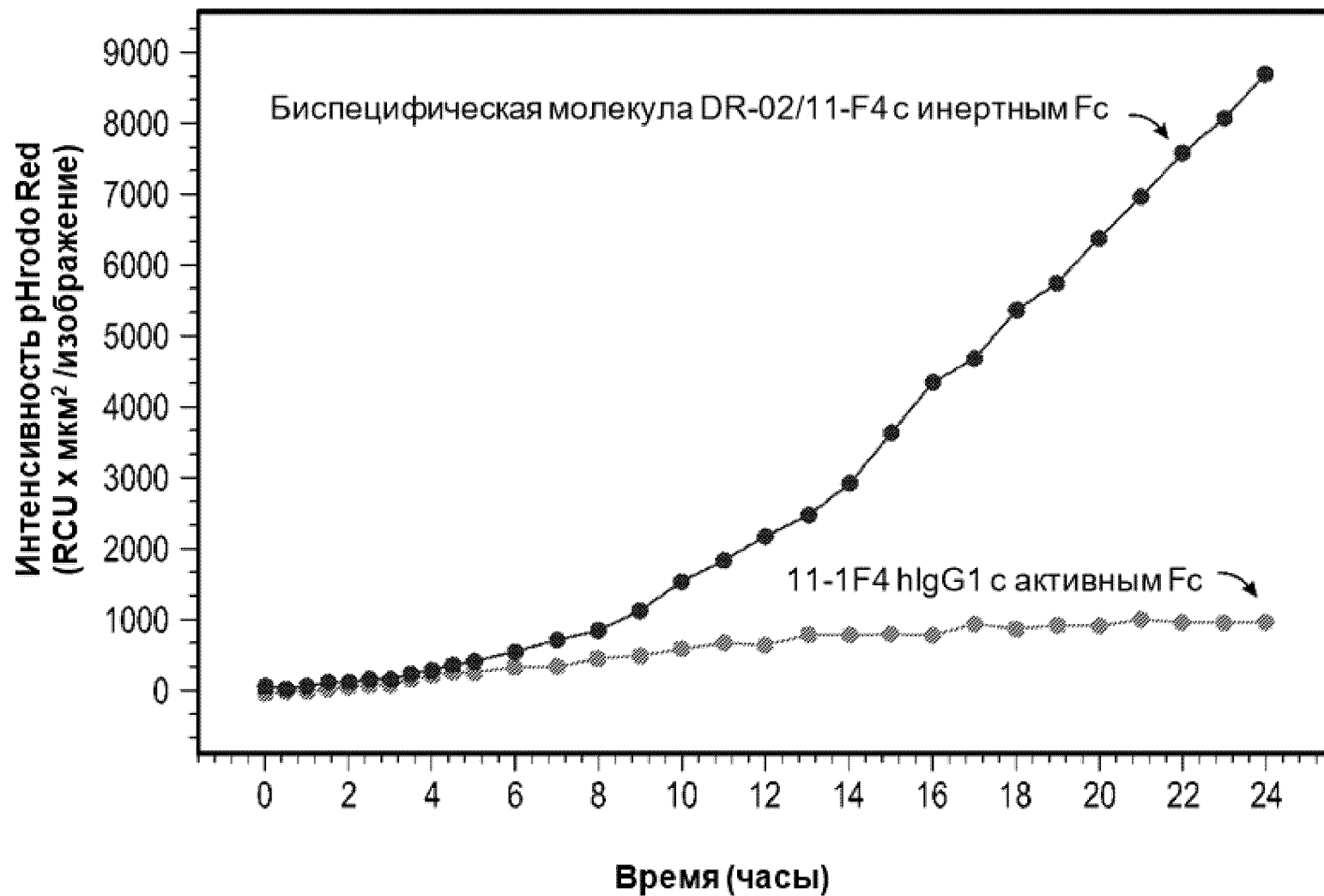
Связывание биспецифической молекулы 2M24/11-1F4 с амилоидами



103/104

Фиг. 65С

Фагоцитоз амилоидных фибрилл легкой цепи моноцитами



104/104

Фиг. 66