

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391882** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.09.06**

(51) Int. Cl. *C07K 16/18* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **ОГРАНИЧЕННЫЕ УСЛОВНО АКТИВИРУЕМЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ**

---

(31) **62/555,943; 62/586,627; 62/587,318**

(32) **2017.09.08; 2017.11.15; 2017.11.16**

(33) **US**

(62) **202090671; 2018.09.06**

(71) Заявитель:  
**МАВЕРИК ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
**(US)**

(72) Изобретатель:  
**Мэй Чэд, Дьюбридж Роберт Б.,**  
**Виноградова Майя, Панчал Ананд**  
**(US)**

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

---

(57) Данное изобретение относится к условным биспецифичным конструкциям перенаправленной активации или COBRA (COnditional Bispecific Redirected Activation constructs), которые вводят в Формате активного пролекарства. При воздействии опухолевых протеаз указанные конструкции разрезаются и активируются таким образом, что они могут связывать как антигены-мишени опухоли (АМО - ТТА - tumor target antigen), так и CD3, тем самым рекрутируя Т-клетки, экспрессирующие CD3, в опухоль, что приводит к терапевтическому эффекту.

---

**A1**

**202391882**

**202391882**

**A1**

## **ОГРАНИЧЕННЫЕ УСЛОВНО АКТИВИРУЕМЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Данная заявка заявляет приоритет в соответствии с §119(e) Раздела 35 Кодекса Законов США по предварительной заявке на патент США 62/555943, поданной 8 сентября 2017 года, предварительной заявке на патент США 62/586627, поданной 15 ноября 2017 года, и предварительной заявке на патент США 62/587318, поданной 16 ноября, 2017, все из которых прямо включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

**ССЫЛКА НА “ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ”, ТАБЛИЦУ ИЛИ ПРИЛОЖЕНИЕ-СПИСОК КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ НА КОМПАКТ-ДИСКЕ.**

[0002] Перечень последовательностей, содержащийся в файле с именем «118459-5005\_ST25.txt» и имеющий размер 984 килобайта, был представлен в электронном виде посредством EFS-Web, и содержимое txt-файла в данный документ полностью включено в качестве ссылки.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Избирательное разрушение отдельной клетки или определенного типа клеток часто желательно в различных клинических условиях. Например, первичной целью терапии рака является специфическое разрушение опухолевых клеток, в то же время сохранение здоровых клеток и тканей как можно более целыми и неповрежденными. Одним из таких способов является индукция иммунного ответа против опухоли, чтобы заставить иммунные эффекторские клетки, такие как клетки естественные киллеры (NK) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), атаковать и разрушать опухолевые клетки.

[0004] Использование интактных моноклональных антител (mAb), которые обеспечивают превосходную специфичность связывания и сродство к антигену, связанному с опухолью, успешно применяется в области лечения и диагностики рака. Тем не менее, большой размер интактных mAb, их плохое биораспределение, низкая активность и длительная сохранность в пуле крови ограничили их клиническое применение. Например, интактные антитела могут проявлять специфическое накопление в области опухоли. В исследованиях биораспределения при точном исследовании опухоли отмечается неоднородное распределение антител с первичным накоплением в периферических областях. Из-за некроза опухоли, неоднородного распределения антигена и повышенного межклеточного тканевого давления невозможно достичь центральных участков опухоли с помощью интактных конструкций антител. Напротив, более мелкие фрагменты антител демонстрируют быструю локализацию к опухоли, проникают глубже в опухоль, а также относительно быстро удаляются из кровотока. Однако многие антитела, включая scFv и другие конструкции, проявляют эффекты «на мишень/вне опухоли», при которых молекула активна на неопухолевых клетках, вызывая побочные эффекты, некоторые из которых могут быть токсичными. Данное изобретение относится к

новым конструкциям, которые селективно активируются в присутствии опухолевых протеаз.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Данное изобретение предоставляет ряд различных белковых композиций для лечения рака. Соответственно, в одном аспекте данное изобретение относится к белкам «Формата 2», содержащим от N- к С-концу: первый однодоменный антигенсвязывающий домен (одАСД - sdABD - single domain antigen binding domain), который связывается с антигеном-мишенью опухоли человека (АМО - ТТА - tumor target antigens) (одАСД-АМО); b) первый линкер доменов; c) ограниченный Fv-домен, содержащий: i) первый переменный тяжелый домен, содержащий vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3; ii) ограничивающий неразрезаемый линкер (ОНПЛ - CNCL - constrained non-cleavable linker); и iii) первый переменный легкий домен, содержащий vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3; d) второй линкер доменов; e) второй одАСД-АМО; f) разрезаемый линкер (ПЛ - CL - cleavable linker); g) ограниченный псевдо Fv-домен, содержащий: i) первый псевдо переменный легкий домен; ii) неразрезаемый линкер (НПЛ - NCL - non-cleavable linker); и iii) первый псевдо тяжелый переменный домен; h) третий линкер доменов; и i) третий одАСД, который связывается с человеческим сывороточным альбумином; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый переменный легкий домен способны связывать CD3 человека, но указанный ограниченный Fv-домен не связывает CD3; указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый псевдо переменный легкий домен внутримолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv; и указанный первый переменный легкий домен и указанный первый псевдо переменный тяжелый домен внутримолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv.

[0006] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам «Формата 1», содержащим от N- к С-концу: a) первый одАСД-АМО; b) первый линкер доменов; c) ограниченный Fv-домен, содержащий: i) первый переменный тяжелый домен, содержащий vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3; ii) ограничивающий разрезаемый линкер (ОПЛ); и iii) первый переменный легкий домен, содержащий vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3; d) второй линкер доменов; e) второй одАСД-АМО; f) разрезаемый линкер (ПЛ); g) ограниченный псевдо Fv-домен, содержащий: i) первый псевдо переменный легкий домен; ii) неразрезаемый линкер (НПЛ); и iii) первый псевдо переменный тяжелый домен; h) третий линкер доменов; и i) третий одАСД, который связывается с человеческим сывороточным альбумином; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый переменный легкий домен способны связывать CD3 человека, но указанный ограниченный Fv-домен не связывает CD3; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый псевдо переменный легкий домен внутримолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv; и при этом указанный первый переменный легкий домен и указанный первый псевдо переменный тяжелый домен внутримолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам «Формата 4», содержащим от N- к С-концу: а) однодоменный антигенсвязывающий домен (одАСД), который связывается с антигеном-мишенью опухоли человека (АМО) (одАСД-АМО); б) первый линкер доменов; в) ограниченный Fv-домен, содержащий: i) первый переменный тяжелый домен, содержащий vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3; ii) ограниченный неразрезаемый линкер (ОНПЛ); и iii) первый переменный легкий домен, содержащий vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3; д) разрезаемый линкер (ПЛ); е) второй одАСД, который связывается с человеческим сывороточным альбумином; ф) линкер доменов; г) ограниченный псевдо Fv-домен, содержащий: i) первый псевдо переменный легкий домен; ii) неразрезаемый линкер (НПЛ); и iii) первый псевдо переменный тяжелый домен; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый переменный легкий домен способны связывать CD3 человека, но указанный ограниченный Fv-домен не связывает CD3; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый псевдо переменный легкий домен внутримолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv; и при этом указанный первый переменный легкий домен и указанный первый псевдо переменный тяжелый домен внутримолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv.

[0007] В дополнительном аспекте для белков Формата 1, Формата 2 и Формата 4, перечисленных выше, указанный первый переменный тяжелый домен является N-концевым по отношению к указанному первому переменному легкому домену, и указанный псевдо переменный легкий домен является N-концевым по отношению к указанному псевдо переменному тяжелому домену.

[0008] В дополнительном аспекте для белков Формата 1, Формата 2 и Формата 4, перечисленных выше, указанный первый переменный тяжелый домен является N-концевым по отношению к указанному первому переменному легкому домену, а указанный псевдо переменный тяжелый домен является N-концевым по отношению к указанному псевдо переменному легкому домену.

[0009] В дополнительном аспекте для белков Формата 1, Формата 2 и Формата 4, перечисленных выше, указанный первый переменный легкий домен является N-концевым по отношению к первому переменному тяжелому домену, а указанный псевдо переменный легкий домен является N-концевым по отношению к указанному псевдо переменному тяжелому домену.

[0010] В дополнительном аспекте для белков Формата 1, Формата 2 и Формата 4, перечисленных выше, указанный первый переменный легкий домен является N-концевым по отношению к первому переменному тяжелому домену, а указанный псевдо переменный тяжелый домен является N-концевым по отношению к указанному псевдо переменному легкому домену.

[0011] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам Формата 1 и 2, в которых указанные первая и вторая АМО являются одинаковыми.

[0012] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам Формата



1 и 2, в которых указанные первая и вторая АМО различны.

[0013] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам Формата 1, 2 и 4, в которых указанные первая и вторая АМО выбраны из EGFR, EpCAM, FOLR1 и B7H3. Данные последовательности могут быть выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 41.

[0014] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам Формата 1, 2 и 4, в которых указанный домен продления периода полураспада имеет SEQ ID NO: 45.

[0015] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к белкам Формата 1, 2 и 4, в которых указанный разрезаемый линкер разрезается человеческой протеазой, выбранной из группы, состоящей из MMP2, MMP9, Меприна А, Меприна В, Катепсина S, Катепсина К, Катепсина L, ГранзимВ, УАП, Калликриенин7, матриптазы и тромбина.

[0016] В следующем аспекте данное изобретение обеспечивает белок, выбранный из группы, состоящей из Pro186, Pro225, Pro226, Pro233, Pro311, Pro312, Pro313, Pro495, Pro246, Pro254, Pro255, Pro256, Pro420, Pro421, Pro432, Pro479, Pro480, Pro187, Pro221, Pro222, Pro223, Pro224, Pro393, Pro394, Pro395, Pro396, Pro429, Pro430 и Pro431.

[0017] В дополнительном аспекте данное изобретение обеспечивает нуклеиновые кислоты, кодирующие белок Формата 1, Формата 2 или Формата 4, как описано в данном документе, а также векторы экспрессии и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие белок.

[0018] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к способам получения белков по данному изобретению и способам лечения пациентов, нуждающихся в этом.

[0019] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к композициям, содержащим пары пролекарственных белков «Формата 3А», содержащим: а) первый белок, содержащий от N- до С-конца: i) первый одАСД-АМО; ii) первый линкер доменов; iii) псевдо Fv-домен, содержащий от N- к С-концу: 1) переменную тяжелую цепь, содержащую vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3; 2) разрезаемый линкер; и 3) первый псевдо переменный легкий домен, содержащий iVLCDR1, iVLCDR2 и iVLCDR3; iv) второй линкер доменов; v) одАСД-ЧСА; а) первый второй белок, содержащий от N- до С-конца: i) третий одАСД, который связывается с антигеном-мишенью опухоли человека; ii) третий линкер доменов; iii) псевдо Fv-домен, содержащий от N- к С-концу: 1) переменную легкую цепь, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3; 2) разрезаемый линкер; и 3) первый псевдо переменный тяжелый домен, содержащий iVHCDR1, iVHCDR2 и iVHCDR3; iv) четвертый линкер доменов; v) одАСД-ЧСА; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый переменный легкий домен способны связывать человеческий CD3, при ассоциации; при этом указанный первый переменный тяжелый домен и указанный первый псевдо переменный легкий домен межмолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv; при этом указанный первый

вариабельный легкий домен и указанный первый псевдо вариабельный тяжелый домен межмолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv; и при этом указанные первый и третий одАСД выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 41.

[0020] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к композициям, содержащим пары пролекарственных белков «Формата 3В», включающие а) первый белок, содержащий от N- до С-конца: i) первый одАСД-АМО; ii) первый линкер доменов; iii) второй одАСД-АМО; iv) второй линкер доменов; iii) псевдо Fv-домен, содержащий от N- к С-концу: 1) вариабельную тяжелую цепь, содержащую vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3; 2) разрезаемый линкер; и 3) первый псевдо вариабельный легкий домен, содержащий iVLCDR1, iVLCDR2 и iVLCDR3; iv) третий линкер доменов; и v) одАСД-ЧСА; а) первый второй белок, содержащий от N- до С-конца: i) третий одАСД-АМО; ii) четвертый домен линкер; iii) четвертый одАСД-АМО; iv) пятый линкер доменов; iii) псевдо Fv-домен, содержащий от N- к С-концу: 1) вариабельную легкую цепь, содержащую VLCDR1, VLCDR2 и VLCDR3; 2) разрезаемый линкер; и 3) первый псевдо вариабельный тяжелый домен, содержащий iVHCDR1, iVHCDR2 и iVHCDR3; iv) шестой линкер доменов; v) одАСД-ЧСА; при этом указанный первый вариабельный тяжелый домен и указанный первый вариабельный легкий домен способны связывать человеческий CD3, при ассоциации; при этом указанный первый вариабельный тяжелый домен и указанный первый псевдо вариабельный легкий домен межмолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv; и при этом указанный первый вариабельный легкий домен и указанный первый псевдо вариабельный тяжелый домен межмолекулярно ассоциируются с образованием неактивного Fv.

[0021] В дополнительном аспекте белки Формата 3А и Формата 3В имеют одАСД-ЧСА, которые имеют SEQ ID NO: 45.

[0022] В дополнительном аспекте белки Формата 3А и Формата 3В имеют одАСД-АМО, который связывается с АМО, выбранным из EGFR, ЕpCAM, FOLR1 и В7Н3. ОдАСД-АМО могут быть выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 41.

[0023] В дополнительном аспекте данное изобретение относится к композициям нуклеиновых кислот, содержащим первые нуклеиновые кислоты, которые кодируют первые белковые члены пары пролекарства, и вторые нуклеиновые кислоты, которые кодируют вторые белковые члены пар, а также векторы экспрессии и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0024] На Фиг. 1 изображен «Формат 1» тип активации протеазы по данному изобретению, называемый в данном документе «ограниченными, разрезаемыми конструкциями» или «ор конструкциями». В данном варианте осуществления типичной

конструкцией является Pro140: существуют АСД для двух АМО (как изображено на Фиг. 1, оба они одинаковы, хотя, как описано в данном документе, они могут быть разными). После разрезания конструкция пролекарства разрезается на три компонента, один из которых содержит домен  $\alpha$ -АМО, связанный через линкер доменов с активным VH  $\alpha$ CD3, второй содержит домен  $\alpha$ -АМО, связанный через линкер доменов с активным VL  $\alpha$ CD3, и «оставшийся» элемент, содержит домен продления периода полураспада, связанный с неактивными VH и VL. Два активных переменных домена затем могут свободно ассоциироваться с образованием функционального анти-CD3-связывающего домена. Следует отметить, что в вариантах осуществления «Формата 1» полученный активный компонент является трехвалентным: имеется одновалентное связывание с CD3 и двухвалентное связывание с АМО, что образует биспецифический связывающий белок, хотя в некоторых случаях эта трехвалентность может быть триспецифической с моновалентным связыванием с CD3, моновалентным связыванием с первым АМО и моновалентным связыванием со вторым АМО. Фиг. 1 также демонстрирует домен человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в качестве домена продления периода полураспада, во многих вариантах осуществления одАСД, как определено в данном документе, хотя, как обсуждается в данном документе, это необязательно и/или он может быть заменен другим доменом продления периода полураспада. Кроме того, домен продления периода полураспада также может быть N-концевым по отношению к конструкции или внутренним. Фиг. 1 также имеет VH и VL Fv и iVH и iVL псевдо Fv в определенном порядке, например, от N- к C-концу, VH-линкер-VL (и iVL-линкер-iVH), хотя и как специалистам в данной области будет понятно, что они могут быть обращены (VL-линкер-VH и iVH-линкер-iVL). Альтернативно, один из этих Fv может находиться в одной ориентации, а другой в другой ориентации, хотя экспрессия белка в ориентации, продемонстрированной в данном документе, была неожиданно выше, чем в других ориентациях.

[0025] На Фиг. 2 изображен «Формат 2» тип активации протеазы по данному изобретению, называемый в данном документе «ограниченными, неразрезаемыми конструкциями» или «ОНРЛ конструкциями», также иногда называемыми в данном документе «конструкциями димеризации», как обсуждалось в данном описании. Данные конструкции не изомеризуются, как обсуждается в данном документе. После разрезания две пролекарственные конструкции разрезаются на четыре компонента, два домена продления периода полураспада (в данном случае одАСД для ЧСА), связанные с двумя псевдодоменами (которые могут или не могут быть способны самоассоциироваться, в зависимости от длины линкеров и инактивирующих мутаций), и две активные части, которые самостоятельно собираются в димерную активную группу, которая содержит четыре домена против АМО (которые могут быть одинаковыми или две одинаковыми, а две другие разными). Следует отметить, что в вариантах осуществления «Формата 2» полученный активный компонент является шестивалентным: имеется двухвалентное связывание с CD3 и четырехвалентное связывание с АМО, что образует биспецифический

связывающий белок, хотя в некоторых случаях эта шестивалентность может быть триспецифической, с двухвалентным связыванием с CD3, двухвалентным связыванием с первым АМО и двухвалентным связыванием со вторым АМО. Фиг. 2 также демонстрирует домен человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в качестве домена продления периода полураспада, во многих вариантах осуществления одАСД, как определено в данном документе, хотя, как обсуждено в данном документе, это необязательно и/или он может быть заменен другим доменом продления периода полураспада. Кроме того, домен продления периода полураспада также может быть N-концевым по отношению к конструкции или внутренним. Фиг. 2 также имеет VH и VL Fv и iVH и iVL псевдо Fv в определенном порядке, например, от N- к C-концу, VH-линкер-VL (и iVL-линкер-iVH), хотя и как специалистам в данной области будет понятно, они могут быть обращены (VL-линкер-VH и iVH-линкер-iVL). Альтернативно, один из этих Fv может находиться в одной ориентации, а другой в другой ориентации, хотя экспрессия белка в ориентации, как продемонстрировано в данном документе, была неожиданно выше, чем в других ориентациях.

[0026] Фиг. 3А - Фиг. 3В изображают конструкции «Формата 3» типа, также иногда называемые «hemi-конструкциями» или «hemi-COBRA™» (COBRA - COnditional Bispecific Redirected Activation construct - условная биспецифичная конструкция перенаправленной активации), как указано в данном документе, поскольку они представляют собой две разные полипептидные цепи, которые вместе составляют МСЕ (multivalent conditionally effective) терапевтическое средство, как дополнительно обсуждается в данном документе. В данном варианте осуществления конструкции доставляются парами, при этом внутримолекулярная самосборка перед разрезанием приводит к неактивным доменам Fv анти-CD3. После разрезания инертные переменные домены высвобождаются, и два активных переменных домена затем межмолекулярно собираются, образуя активный анти-CD3-связывающий домен. Два одАСД-АМО связываются с соответствующим рецептором на поверхности опухолевых клеток, и расщепление осуществляется протеазой. Это обеспечивает межмолекулярную сборку, поскольку молекулы физически удерживаются на месте, способствуя сборке активного домена анти-CD3. Как и выше для Форматов 1 и 2, в этом варианте осуществления порядок от N- к C-концу переменных доменов может быть обратным или смешанным. Кроме того, одАСД (ЧСА) может находиться на N- или C-конце каждой полуконструкции. Pro16 имеет одАСД (ЧСА) на C-конце, а Pro17 имеет его на N-конце (см. Pro19, SEQ ID NO: XX, имеет одАСД (ЧСА) на C-конце). На Фиг. 3А продемонстрированы конструкции Формата 3 с одним доменом одАСД-АМО на одну полу-конструкцию, а на Фиг. 3В продемонстрированы конструкции Формата 3 с двумя одАСД-АМО на одну полу-конструкцию в виде «двойного нацеливания» или «гетеро нацеливания». Обратите внимание, что на Фиг. 3В используются FOLR1 и EGFR в качестве двух АМО, но также могут использоваться другие комбинации, как описано в данном документе.

[0027] На Фиг. 4 изображены конструкции «Формата 4» типа, которые аналогичны конструкциям типа «2», но имеют только один одАСД-АМО. На данной фигуре продемонстрированы одАСД-АМО-EGFR, но, как будет понятно специалистам в данной области техники, также можно использовать другие АМО. После разрезания конструкция пролекарства разрезается на два компонента: домен удлинения периода полураспада (в данном случае одАСД для ЧСА), связанный с псевдо Fv, и активный фрагмент, который в присутствии второго активного фрагмента из другой расщепленной молекулы самоорганизуется в димерный активный фрагмент, который содержит два домена против АМО. Следует отметить, что в вариантах осуществления «Формата 4» полученный активный компонент является четырехвалентным: имеется двухвалентное связывание с CD3 и двухвалентное связывание с АМО, что образует биспецифический связывающий белок. Фиг. 4 также демонстрирует домен человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в качестве домена продления периода полураспада, во многих вариантах осуществления одАСД ( $1/2$ ), как определено в данном документе, хотя, как обсуждено в данном документе, это необязательно и/или он может быть заменен другими доменами продления времени полураспада. Кроме того, домен продления периода полураспада также может быть N-концевым или внутренним по отношению к конструкции. Фиг. 4 также имеет VH и VL Fv и iVH и iVL псевдо Fv в определенном порядке, например, от N- к С-концу, VH-линкер-VL (и iVL-линкер-iVH), хотя и как специалистам в данной области будет понятно, что они могут быть обращены (VL-линкер-VH и iVH-линкер-iVL). Альтернативно, один из этих Fv может находиться в одной ориентации, а другой в другой ориентации, хотя экспрессия белка в ориентации, как продемонстрировано в данном документе, была неожиданно выше, чем в других ориентациях.

[0028] Фиг. 5A - Фиг. 5G изображает ряд последовательностей по данному изобретению. CDR подчеркнуты для антигенсвязывающих доменов. Как более подробно описано в данном документе, эти домены могут быть собраны в широком разнообразии конфигураций в данном изобретении, включая ориентации «Формата 1», «Формата 2», «Формата 3» и «Формата 4». Следует отметить, что SEQ ID NO: 90 разрезается с помощью MMP9 немного быстрее, чем SEQ ID NO: 75 и 76, а SEQ ID NO: 91 разрезается медленнее, чем SEQ ID NO: 75 и 76.

[0029] На Фиг. 6A - Фиг. 6B изображено несколько подходящих сайтов разрезания протеазой. Как будет понятно специалистам в данной области, эти сайты разрезания могут использоваться в качестве разрезаемых линкеров. В некоторых вариантах, например, когда требуются более гибкие разрезаемые линкеры, могут присутствовать дополнительные аминокислоты (обычно глицины и серины), которые являются N- или С-концевыми по отношению к этим сайтам разрезания.

[0030] Фиг. 7A - Фиг. 7D изображает некоторые данные, связанные со структурами «Формата 3» или «hemi-COBRA™». Это демонстрирует, что конструкции Формата 3 связываются кооперативно с CD3 после разрезания протеазой (в данном случае ЕК протеазой, хотя можно использовать любой из сайтов разрезания протеаз, описанных в

данном документе и изображенных на Фиг. 5 и Фиг. 6) и образуют CD3-связывающий сайт, как продемонстрировано сэндвич-анализом FACS.

[0031] Фиг. 8А - Фиг. 8D демонстрирует, что расщепление протеазой совместно активирует уничтожение Т-клетками EGFR+клетки-мишени с помощью комплементарных пар hemi-COBRA™. Фиг. 8А и Фиг. 8В демонстрируют, что конструкции в изоляции, но разрезанные с различными концентрациями протеазы, не влияют на жизнеспособность клеток-мишеней. Тем не менее, Фиг. 8С демонстрирует, что в комбинации, в присутствии протеазы, жизнеспособность клеток-мишеней значительно снижается. Фиг. D демонстрирует общий механизм.

[0032] На Фиг. 9 продемонстрированы некоторые нецелевые контроли для использования в анализах для проверки эффективности конструкций Формата 1.

[0033] Фиг. 10А - Фиг. 10F демонстрирует, что генерация активного домена связывания CD3 зависит от связывания с мишенью обоих «плеч», например доменов одАСД-АМО, один из которых находится на каждой из двух конструкций. Анализ TDCC проводили, как описано в примерах.

[0034] На Фиг. 11 продемонстрирована схема подходящих пар hemi-COBRA™. «Mer» обозначает сайт разрезания меприн-протеазы, «His-6» представляет собой метку, которая более подробно обсуждается в данном документе, ST14 представляет собой сайт разрезания матриптазной протеазой, а «Thb» представляет собой сайт разрезания тромбиновой протеазой.

[0035] Фиг. 12А - На Фиг. 12С продемонстрированы данные TDCC, связанные с конструкциями Фиг. 11. На Фиг. 12А продемонстрировано, что добавление предварительно расщепленных пар hemi-COBRA приводит к эффективности на клетках OvCAR8, На Фиг. 12В продемонстрировано, что добавление предварительно расщепленных пар hemi-COBRA приводит к эффективности на клетках НСТ116, а На Фиг. 12С продемонстрировано что добавление предварительно расщепленных пар hemi-COBRA приводит к эффективности на клетках LoVo, которые все являются линиями раковых клеток.

[0036] Фиг. 13А - Фиг. 13В демонстрирует, что линкер MMP9 стабилен *in vivo*. Мышам NSG вводили одну внутривенную болюсную дозу либо Pro40 (разрезаемого MMP9), Pro74 (не разрезаемого) через хвостовую вену при уровне дозы 0,5 мг/кг. Раствор дозы для каждого соединения готовили в носителе из 25 mM лимонной кислоты, 75 mM L-аргинина, 75 mM NaCl и 4% сахарозы, pH 7,0. Два образца крови были собраны в предварительно выбранные моменты времени у каждого животного, один к началу исследования, собранный с помощью орбитального кровотечения или поднижнечелюстного кровотечения, а другой в конечный момент времени с помощью пункции сердца. Временные точки для сбора крови были 0,083, 1, 6, 24, 72 и 168 часов. Плазму готовили из каждого отдельного образца крови, используя пробирки K<sub>2</sub>EDTA. Концентрации определяли с применением анализа MSD с mAb, специфичным к анти-ЧСА одАСД, и определяли с помощью внеклеточного домена EGFR.

[0037] На Фиг. 14 изображены схемы конструкций hemi-COBRA™ Формата 3А, использованных в экспериментах, изображенных на Фиг. 15. Pro51 является положительным контролем, поскольку он «всегда включен», потому что он образует активный анти-CD3 Fv. Pro98 является отрицательным контролем, так как его одАСД направлен против лизоцима куриного яйца, который не экспрессируется опухолью. Pro77 и Pro53 - это пара пролекарств Формата 3А, использующая одАСД против EGFR и сайт разрезания MMP9. Pro74 и Pro72 представляют собой пару Формата 3А с отрицательным контролем, поскольку они не имеют сайтов разрезания.

[0038] На Фиг. 15 продемонстрировано, что конструкции Формата 1 работают для регрессии опухолей *in vivo* с применением двух разных линий опухолевых клеток, имплантированных мышам, с использованием протоколов в Примерах. Противоопухолевая активность в отношении конструкций hemi-COBRA (Pro77 и Pro53) зависела от включения как одАСД против EGFR, так и разрезаемых MMP9 линкеров, наряду с активным анти-CD3 Fv.

[0039] На Фиг. 16 продемонстрирована схема формата следующего поколения, полноразмерной конструкции, которая имеет два псевдо Fv-домена с разрезаемыми сайтами между ними, как в целом описано в US 2018/0134789, включенном в данное описание посредством ссылки. Однако, как продемонстрировано на следующих рисунках, эта конструкция полной длины первого поколения не демонстрирует очень хорошей условности, поскольку она может изомеризоваться с образованием как активной, так и неактивной конструкции.

[0040] На Фиг. 17 продемонстрировано, что пары конструкций Формата 3А на самом деле демонстрируют лучшую условность, чем конструкции полной длины Pro100 первого поколения.

[0041] На Фиг. 18 продемонстрированы дополнительные полноразмерные конструкции первого поколения, протестированные на Фиг. 19.

[0042] На Фиг. 19 продемонстрировано, что конструкции первого поколения демонстрируют высокую активность даже в неразрезанном Формате, например плохую условность.

[0043] На Фиг. 20 продемонстрировано, что конструкции полной длины первого поколения демонстрируют два пика мономеров на аналитическом SEC.

[0044] На Фиг. 21 продемонстрирована схема причины неразрезанной активности, заключающейся в том, что полноразмерное первое поколение конструкторов изомеризуется с образованием двух конформаций, одна из которых неактивна, поскольку не образуется активный анти-CD3 Fv («бивалентный scFv») и другой, который активен в отсутствие протеазы, тип конфигурации - «однопочечное диатело». См. PEDI 23 (8): 667-677 (2010).

[0045] На Фиг. 22 продемонстрированы результаты анализа TDCC, проведенного при 37°C в течение 2 дней, с однопочечными конструкциями первого поколения. Результаты демонстрируют, что нерасщепленные конструкции демонстрируют сильное

уничтожение. Данные результаты привели к созданию конструкций Формата 1.

[0046] 23A - 23G продемонстрированы конструкции Формата 1, используемые в данном изобретении. Как будет понятно специалистам в данной области техники и описано в данном документе, они изображены с нацеливающим фрагментом одАСД-EGFR, хотя могут использоваться одАСД для других АМО.

[0047] На Фиг. 24 продемонстрировано, что конструкции Формата 1 (в данном случае Pro140) образуют один изомер, который стабилен при 37°C.

[0048] На Фиг. 25 продемонстрировано, что конструкции Формата 1 имеют очень низкое связывание с человеческим CD3 в неразрезанном Формате, что измеряется анализом октетов. Верхняя линия - Pro120, средняя линия - Pro51 (положительный контроль), а нижние линии - Pro140, выдерживаемые при 4°C или 37°C в течение 3 дней.

[0049] На Фиг. 26 также продемонстрировано, что конструкции Формата 1 имеют очень низкую активность TDCC в неразрезанной форме.

[0050] На Фиг. 27 изображена конкретная конструкция Формата 1, Pro140, используемая в *in vivo* тестировании с применением одАСД-EGFR в качестве целевых фрагментов и сайта разрезания MMP9.

[0051] Фиг. 28А - Фиг. 28В демонстрирует регрессию опухоли с применением конструкции Формата 1.

[0052] На Фиг. 29 продемонстрировано, что благодаря сайту разрезания в ограниченном Fv можно генерировать несколько разных фрагментов: частично разрезанный фрагмент и полностью разрезанный фрагмент. Неожиданно, частично разрезанный формат является более активным, чем полностью разрезанный формат, что приводит к генерации Формата 2.

[0053] На Фиг. 30 продемонстрирован ряд схем Формата 2, все из которых используют домены, нацеленные на одАСД-EGFR, хотя, как описано в данном документе и перечислено в последовательностях, могут использоваться одАСД для других АМО. Pro51 и Pro201 являются положительными контролями (в активной конфигурации «hemi»), а Pro214 является полноразмерным отрицательным контролем, так как сайт разрезания отсутствует.

[0054] На Фиг. 31 продемонстрирована активность TDCC конструкции Формата 2 Pro187, в которой используется сайт разрезания меприна. Pro187 в анализе TDCC был в 1200 раз более активным при добавлении предварительно разрезанным, чем при добавлении без разрезания. Предварительно разрезанный Pro187 продемонстрировал активность, которая упала между положительными контролями Pro51 и Pro201. Неразрезанный Pro187 продемонстрировал активность, сходную с Pro214, который не содержит разрезаемого протеазой линкера.

[0055] На Фиг. 32 продемонстрирована активность TDCC конструкции Формата 2 Pro186, которая использует сайт разрезания MMP9. Pro186 в анализе TDCC был в 18 раз более активным при добавлении предварительно разрезанным, чем при добавлении без разрезания. Предварительно разрезанный Pro186 продемонстрировал активность, которая



упала между положительными контролями Pro51 и Pro201. Неразрезанный Pro186 продемонстрировал большую активность, чем Pro214, который не содержит разрезаемого протеазой линкера.

[0056] На Фиг. 33 продемонстрировано, что конструкция Pro186 связывается с клетками, которые имеют разные уровни рецепторов EGFR, при этом клетки CHO не экспрессируют EGFR на клеточной поверхности. Pro186 насыщает клетки, экспрессирующие различные уровни EGFR при сходных концентрациях COBRA.

[0057] На Фиг. 34 продемонстрирована схема конструкций Формата 2, использованных в исследованиях *in vivo* Фиг. 35, все из которых используют домены, нацеленные на одАСД-EGFR.

[0058] На Фиг. 35 продемонстрировано, что конструкция Формата 2 Pro186 обладает высокой эффективностью при обеих концентрациях и лучше, чем конструкция Формата 1 Pro140 при более низких концентрациях.

[0059] На Фиг. 36 продемонстрирован ряд конструкций Формата 2, основанных на Pro186, но с различными сайтами разрезания протеазой. Хотя все эти конструкции используют одАСД-EGFR для обоих нацеливающих доменов, могут использоваться другие одАСД для разных АМО, которые могут быть одинаковыми или разными. Таким образом, можно выполнить как гомо-таргетинг (оба нацеливают одАСД на один и тот же АМО), так и гетеро-таргетинг (один одАСД на первый АМО и другой на другой АМО).

[0060] На Фиг. 37 продемонстрированы схемы для различных конструкций Формата 2, которые изменяют длину линкера между доменами Fv. Они продемонстрированы с использованием сайта разрезания MMP9, хотя другие могут быть использованы, как описано в данном документе. Точно так же, хотя все эти конструкции используют одАСД-EGFR для обоих доменов-мишеней, могут использоваться другие одАСД для разных АМО, и они могут быть одинаковыми или разными.

[0061] На Фиг. 38 продемонстрировано, что длина линкера для псевдо Fv может варьироваться, например, что конструкция Формата 2 с коротким линкером между активным Fv («коротким активным») и более длинным линкером между псевдо Fv («длинным неактивным») проявляет активность, аналогичную «короткому активному» с «коротким неактивным». Таким образом, условность конструкции COBRA не зависит от ограничения активных и неактивных scFv-линкеров; пока один из них ограничен, сворачивание одноцепочечного диатела, по-видимому, предпочтительнее сворачивания двухвалентного scFv.

[0062] На Фиг. 39 продемонстрировано, что длина линкера для активного Fv может варьироваться, например, конструкции Формата 2 с «длинным активным» и «коротким неактивным» ведут себя аналогично конструкциям «короткий активный» и «короткий неактивный». Таким образом, условность конструкции COBRA не зависит от ограничения активных и неактивных scFv-линкеров; пока один из них ограничен, сворачивание одноцепочечного диатела, по-видимому, предпочтительнее сворачивания двухвалентного scFv.

[0063] Фиг. 40А - Фиг. 40С демонстрирует схемы для ряда различных конструкций. Pro188 - это конструкция Формата 1, которая похожа на Pro140, за исключением длинного линкера (16-мерный) в псевдо Fv. Pro189 и Pro190 (конструкции Формата 2) аналогичны Pro186 и Pro187, за исключением длинного линкера (16-мерный) в псевдо Fv-домене. Pro191 и Pro192 (также конструкции Формата 2) аналогичны Pro189 и Pro190, за исключением того, что они имеют дополнительный сайт разрезания перед одАСД (1/2). Pro193 (Формата 4) имеет один домен нацеливания EGFR, iVH и iVL переставлены в обратном порядке и дополнительный сайт разрезания расположен перед одАСД (1/2). Pro195 - это конструкция Формата 2, аналогичная Pro186, с нацеливающими доменами, которые связываются с одним и тем же АМО, EGFR, но с разными эпитопами. Pro196, Pro197 и Pro198 являются конструкциями Формата 2 с переставленными вариабельными доменами.

[0064] Фиг. 41 изображает тот факт, что различные клоны одАСД, направленные на человеческий FOLR1, демонстрируют дифференциальное уничтожение. Конструкцию типа Pro22 (Pro51 с последовательностью FLAG вместо НРЛ), которая связывается с человеческим FOLR1, сравнивали с конструкцией Pro22-EGFR против ряда семейств клеточных линий.

[0065] На Фиг. 42 продемонстрированы схемы для четырех конструкций одАСД-FOLR1, включая использование положительного контроля Pro201 с применением одАСД-EGFR2 (с двумя молекулами, межмолекулярно связывающимися для образования двух активных Fv против CD3) и двух тестовых конструкций Формата 2, Pro311, с применением h77.2 одАСД и Pro312 с применением h59.3 одАСД, а также два отрицательных контроля, Pro299 с применением h77.2 одАСД и Pro303 с применением h59.3 одАСД.

[0066] Фиг. 43 изображает схемы конструкций Формата 2 для дизайна FOLR/MMP9 *in vivo*.

[0067] На Фиг. 44 продемонстрирована эффективность конструкции Pro312 *in vivo* и продемонстрировано, что разрезаемый линкер MMP9 необходим для противоопухолевой активности.

[0068] На Фиг. 45 изображены схемы некоторых форматов с применением одАСД для человеческого В7Н3 (одАСД-В7Н3), включая Pro244, положительный контроль (с применением одАСД-В7Н3 (hF7) (с двумя молекулами, межмолекулярно ассоциирующимися с образованием двух активных Fv против CD3), и двумя тестовыми конструкциями Формата 2, Pro225, конструкция Формата 2 и Pro295, отрицательный контроль, лишенный сайта разрезания.

[0069] Фиг. 46 демонстрирует, что Pro225 имеет большую условность по сравнению с контрольным Pro295.

[0070] На Фиг. 47 продемонстрировано, что конструкция Формата 2 с применением мепринового линкера, Pro373, демонстрирует большую условность по сравнению с Pro295.

[0071] На Фиг. 48 продемонстрирован ряд конструкций одАСД-В7Н3 (с применением последовательности hF12), на которых продемонстрирован положительный контроль Pro51 с применением одАСД-EGFR, положительный контроль Pro244 с применением одАСД-hF12 В7Н3, тестовая конструкция, Pro226 и отрицательный контроль Pro296 без сайта разрезания.

[0072] На Фиг. 49 продемонстрирована хорошая условность конструкции Pro226 в анализе TDCC.

[0073] На Фиг. 50 продемонстрирована гуманизация одАСД для человеческого EpCAM.

[0074] На Фиг. 51 продемонстрирована схема нескольких форматов: Pro22hVIB13 и Pro205 являются положительными контролями, Pro199 является конструкцией Формата 2, а Pro175 является отрицательным контролем.

[0075] На Фиг. 52 продемонстрирована активность TDCC конструкций одАСД-EpCAM, демонстрирующая хорошую условность.

[0076] Фиг. 53А - Фиг. 53В демонстрирует активность TDCC конструкции одАСД-EpCAM Pro199, демонстрируя хорошую условность в моделях клеток HT29 и LoVo.

[0077] Фиг. 54А - Фиг. 54В демонстрирует активность TDCC конструкции одАСД-EpCAM Pro200, которая демонстрирует хорошую условность в моделях клеток HT29 и LoVo.

[0078] На Фиг. 55 продемонстрирована схема Pro255, в которой применяются два разных одАСД-АМО, один для EGFR (одАСД-EGFR), а другой для EpCAM (одАСД-EpCAM), по сравнению с Pro199, с двойными одАСД EpCAM. Они иногда упоминаются в данном документе как конструкции «гетеро-нацеливания», в данном случае это конструкция Формата 2.

[0079] На Фиг. 56 продемонстрировано, что молекула двойного нацеливания Pro255 с сайтом разрезания MMP9 демонстрирует хорошую условность.

[0080] На Фиг. 57А - Фиг. 57D продемонстрированы результаты экспериментов с тремя различными типами клеток. Сначала были созданы трансфектанты Раджи с одинаковыми уровнями экспрессии EpCAM, EGFR и EpCAM+EGFR (данные не продемонстрированы). Затем Pro255, который нацелен как на EpCAM, так и на EGFR, был протестирован в анализах TDCC с применением каждого типа клеток. Фиг. А демонстрирует родительскую линию Раджи, которая не экспрессирует ни один из рецепторов. Фиг. 57В демонстрирует условность на линии EpCAM. Фиг. 57С демонстрирует условность на линии EGFR. Фиг. 57D демонстрирует условность на линии EpCAM/EGFR.

[0081] На Фиг. 58 продемонстрирована схема конструкции Формата 4 Pro258.

[0082] Фиг. 59А - Фиг. 59В демонстрирует, что Pro258 является условным как в FBS, так и в сыворотке человека. Состояние линкера MMP9 недооценивается из-за активности MMP9 в культуре. Интересно, что активность TDCC Pro51 ингибируется связыванием ЧСА, тогда как активность TDCC Pro258 аналогична активности Pro51 в

присутствии ЧСА. Наконец, условность Pro258 несколько увеличивается в присутствии ЧСА в 6 раз.

[0083] Фиг. 60А - Фиг. 60С демонстрирует расщепление субстрата MMP9 другими MMP.

[0084] Фиг. 61А - Фиг. 61В демонстрирует некоторые иллюстративные конструкции и их форматы.

[0085] Фиг. 62А - Фиг. 62U демонстрируют ряд последовательностей по данному изобретению, хотя многие дополнительные последовательности также обнаружены в перечне последовательностей. CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, линкеры подчеркнуты дважды (разрезаемые линкеры выделены курсивом и подчеркнуты дважды), а разделение доменов обозначено знаком «/». Все His6 тэги являются необязательными, так как они могут быть использованы для снижения иммуногенности у людей, а также в качестве меток для очистки.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Вступление

[0086] Данное изобретение направлено на способы снижения токсичности и побочных эффектов биспецифичных антител (включая антителоподобные функциональные белки), которые связываются с важными физиологическими мишенями, такими как CD3 и опухолевые антигены. Многие антигенсвязывающие белки, такие как антитела, могут иметь значительные побочные эффекты вне мишени, и, таким образом, существует необходимость активировать только способности связывания терапевтической молекулы в непосредственной близости от ткани заболевания, чтобы избежать взаимодействия вне мишени. Соответственно, данное изобретение направлено на многовалентные условно-эффективные («МСЕ») белки, которые имеют ряд функциональных белковых доменов. В общем, один из этих доменов представляет собой антигенсвязывающий домен (АСД), который будет связывать антиген-мишень опухоли (АМО), а другой представляет собой АСД, который будет связывать Т-клеточный антиген, такой как CD3, при определенных условиях. Кроме того, белки МСЕ также включают один или несколько сайтов разрезания протеазой. То есть терапевтические молекулы изготавливаются в Формате, подобном пролекарству, где CD3-связывающий домен неактивен, пока не подвергается воздействию опухолевой среды. Среда опухоли содержит протеазы, так что при воздействии протеазы пролекарство разрезается и становится активным.

[0087] Обычно это достигается с помощью белков, которые включают «псевдо» переменный тяжелый домен и «псевдо» переменный легкий домен, направленный на антиген Т-клеток, такой как CD3, которые удерживают Fv CD3 МСЕ в неактивном Формате как обсуждается в данном документе Поскольку АМО нацеливает МСЕ на окружение опухоли, МСЕ, таким образом, подвергается воздействию протеазы. После разрезания активный переменный тяжелый домен и активный легкий домен теперь могут спариваться с образованием одной или нескольких АСД активных по отношению к

CD3 и, таким образом, рекрутировать T-клетки к опухоли, что приводит к лечению.

[0088] Обычно, домен связывания CD3 («Fv») имеет ограниченный формат, в котором линкер между активным переменным тяжелым доменом и активным переменным легким доменом, который традиционно образует Fv, слишком короткий, чтобы позволить двум активным переменным доменам связываться друг с другом; он называется «ограничивающим линкером»; они могут быть ограничены и разрезаемы (ОРЛ, как используется в Формате 1) или ограничены и не разрезаемы (ОНРЛ, как используется в Формате 2). Вероятнее в пролекарственном (например, неразрезанном) Формате пролекарственный полипептид также содержит «псевдо Fv домен». Псевдо-Fv-домен содержит переменный тяжелый и легкий домен со стандартными каркасными участками, но «инертными» или «неактивными» CDR. Псевдо-Fv-домен также имеет ограничивающий линкер между неактивными переменными тяжелыми и неактивными переменными легкими доменами. Поскольку ни Fv, ни псевдо Fv-домены не могут самоорганизоваться из-за стерических ограничений, существует внутримолекулярная сборка, которая связывает aVL с iVH и aVH с iVL, благодаря сродству каркасных участков каждого. Однако из-за «инертных» псевдодоменов CDR, полученные в результате АСД не будут связывать CD3, таким образом предотвращая нежелательную токсичность. Однако в присутствии протеаз, которые находятся в опухоли или рядом с ней, конструкция пролекарства разрезается так, что псевдо Fv-домен высвобождается с поверхности и, таким образом, позволяет «реальным» переменным тяжелому и переменным легкому доменам связываться внутримолекулярно (например, две разрезанные конструкции объединяются), таким образом, запускается активное связывание CD3 и, как следствие, эффективность против опухоли. Данные конструкции обычно упоминаются в данном документе как условные биспецифичные конструкции перенаправленной активации, или COBRA™ (COnditional Bispecific Redirected Activation constructs). Стабильность внутримолекулярной сборки продемонстрирована в экспериментах по условности (зависимости от условий), согласно которым в отсутствие протеазы нерасщепленные конструкции не имеют активности (например, не образуется активный связывающий CD3 домен).

[0089] Интересно, что для простоты описания, хотя все эти конструкции упоминаются в данном документе как «ограниченные», дополнительная работа демонстрирует, что внутримолекулярная сборка предпочтительна, даже если один из Fv-доменов не ограничен, например, один из доменов может иметь более длинный, гибкий линкер. То есть так, как продемонстрировано на Фиг. 37, Фиг. 38 и Фиг. 39. Внутримолекулярная сборка все еще происходит (например, нерасщепленные конструкции не активны в отсутствие разрезания протеазой), если только один из Fv-доменов, либо один с активным VL и VH, или псевдо Fv доменом, ограничен. Однако в современных системах, когда оба линкера ограничивающие, белок имеет лучшую экспрессию. Однако, как будет понятно специалистам в данной области техники, любая из конструкций Формата 1, Формата 2 или Формата 4 в данном документе может иметь один

из этих Fv-доменов с «неограничивающим» или «гибким» линкером. Для удобства ссылки конструкции продемонстрированы с обоими доменами Fv в ограниченном Формате.

[0090] Конструкции и форматы изобретения являются вариациями по сравнению с изобретениями, описанными в WO2017/156178, которая полностью включена в данное описание посредством ссылки. Как продемонстрировано на Фиг. 21, предыдущие конструкции обладают способностью изомеризоваться благодаря присутствию двух наборов доменов VH и VL в одном полипептиде, образуя как двухвалентный scFv, так и одноцепочечное диатело. Даже после очистки каждой изоформы двухвалентная конструкция все еще может достигать равновесия с изоформой диатела. Поскольку одноцепочечное диатело обладает способностью связываться с CD3 в отсутствие разрезания протеазой, пригодность конструкции снижается.

[0091] Чтобы решить эту проблему, данное изобретение предусматривает четыре отдельных типа конструкций для выполнения этой условной активации. Активация пролекарства может происходить одним из четырех основных способов, как обычно продемонстрировано на фигурах. На Фиг. 1 продемонстрирован механизм «Формата 1». В данном варианте осуществления конструкция пролекарства имеет два сайта разрезания: один между доменами VH и VL ограниченного Fv, который высвобождает два переменных домена для связывания, и второй в сайте, который высвобождает псевдо Fv-домен из конструкции пролекарства, оставляя две молекулы, которые ассоциируются благодаря встроенной способности к самосборке переменного тяжелого и переменного легкого доменов, каждый из которых также имеет антигенсвязывающий домен направленный на опухолевый антиген, что позволяет рекрутировать Т-клетки в сайт опухоли.

[0092] В альтернативном варианте осуществления конструкция пролекарства продемонстрирована на Фиг. 2, механизм «Формата 2». В данном варианте осуществления линкер доменов между активной переменной тяжелой и активной легкой цепями является ограничивающим, но не разрезаемым линкером («ОНРЛ»). В Формате пролекарства неактивные VH и VL ограниченного псевдо Fv-домена ассоциируются с VH и VL ограниченного Fv-домена, так что CD3-связывание отсутствует. Однако, как только происходит расщепление в опухолевой среде, два разных активированных белка, каждый из которых содержит активный переменный тяжелый и легкий домен, связываются с образованием двух анти-CD3-связывающих доменов.

[0093] В дополнение к рассмотренным выше форматам COBRA «одноцепочечного белка», где все компоненты содержатся в одной аминокислотной последовательности, существуют также конструкции, основанные на двух белках «hemi-COBRA», которые действуют парами, как продемонстрировано на Фиг. 3. В данном варианте осуществления каждый белок имеет один активный и один инертный переменный домен, разделенные сайтом разрезания протеазой. Каждая молекула содержит АМО-связывающий домен, так что, когда молекулы связываются с АМО и подвергаются воздействию опухолевой протеазы, инертные домены отщепляются и два активных переменных домена

самоорганизуются, образуя анти-CD3-связывающий домен.

[0094] Кроме того, изобретение также предоставляет конструкции «Формата 4», как продемонстрировано на Фиг.4. Они аналогичны конструкциям «Формата 2», за исключением того, что используется один АСД для АМО, так что после разрезания две молекулы пролекарства теперь образуют четырехвалентную биспецифическую конструкцию, содержащую два активных домена против CD3, как далее описано ниже.

[0095] Соответственно, форматы и конструкции данного изобретения находят применение при лечении заболеваний.

#### Определения

[0096] Для того чтобы применение могло быть более полно понято, ниже приведены несколько определений. Такие определения предназначены для охвата грамматических эквивалентов.

[0097] Под “аминокислотой” и “аминокислотной идентичностью” в контексте данного описания подразумевается одна из 20 встречающихся в природе аминокислот или любых неприродных аналогов, которые могут присутствовать в специфическом определенном положении. Во многих вариантах осуществления «аминокислота» означает одну из 20 встречающихся в природе аминокислот. Под белком в данном документе подразумевается, по меньшей мере, две ковалентно связанные аминокислоты, что включает белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды.

[0098] Под “модификацией аминокислоты” в данном документе подразумевается аминокислотная замена, вставка и/или делеция в полипептидной последовательности или изменение фрагмента, химически связанного с белком. Например, модификация может представлять собой измененную углеводную или ПЭГ-структуру, присоединенную к белку. Для ясности, если не указано иное, аминокислотная модификация всегда относится к аминокислоте, кодируемой ДНК, например, к 20 аминокислотам, которые имеют кодоны в ДНК и РНК. Предпочтительной аминокислотной модификацией в данном описании является замена.

[0099] Под “аминокислотной заменой” или “заменой” в данном документе подразумевается замена аминокислоты в конкретном положении в исходной полипептидной последовательности другой аминокислотой. В частности, в некоторых вариантах осуществления замена представляет собой аминокислоту, которая не встречается в природе в конкретном положении, либо не встречается в природе в организме, либо в любом организме. Для ясности, белок, который был сконструирован для изменения последовательности, кодирующей нуклеиновую кислоту, но не для замены исходной аминокислоты (например, обмена CGG (кодирующего аргинин) на CGA (все еще кодирующего аргинин) для повышения уровня экспрессии в организме хозяина), не является аминокислотной заменой; то есть, несмотря на создание нового гена, кодирующего тот же белок, если белок имеет ту же аминокислоту в той конкретной Положения, с которой он начинался, это не замена аминокислоты.

[00100] Под “вставкой” или “вставкой аминокислоты”, как используется в данном

документе, подразумевается добавление аминокислотной последовательности в определенном положении в исходной полипептидной последовательности.

[00101] Под “делецией” или “удалением аминокислоты”, как используется в данном документе, подразумевается удаление аминокислотной последовательности в конкретной Положения в исходной полипептидной последовательности.

[00102] Полипептиды по данному изобретению специфически связываются с CD3 и антигенами-мишенями опухоли (АМО), такими как рецепторы клеток-мишеней, как описано в данном документе. «Специфичное связывание» или «специфично связывается» или «специфично для» конкретного антигена или эпитопа означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифичного взаимодействия. Специфичное связывание может быть измерено, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу сходной структуры, которая не обладает активностью связывания. Например, специфичное связывание может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, которая похожа на мишень.

[00103] Специфичное связывание для конкретного антигена или эпитопа может проявляться, например, антителом, имеющим KD к антигену или эпитопу, по меньшей мере, около  $10^{-4}$  М, по меньшей мере,  $10^{-5}$  М, по меньшей мере, около  $10^{-6}$  М, по меньшей мере, около  $10^{-7}$  М, по меньшей мере, около  $10^{-8}$  М, по меньшей мере, около  $10^{-9}$  М, альтернативно, по меньшей мере, около  $10^{-10}$  М, при по меньшей мере, около  $10^{-11}$  М, по меньшей мере, около  $10^{-12}$  М или более, при этом KD относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело, которое специфически связывает антиген, будет иметь KD, который в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз выше для контрольной молекулы относительно антигена или эпитопа.

[00104] Кроме того, специфическое связывание для конкретного антигена или эпитопа может проявляться, например, антителом, имеющим КА или Ка для антигена или эпитопа, по меньшей мере, в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 в 10000 или более раз больше для указанного эпитопа по сравнению с контролем, при этом КА или Ка относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Аффинность связывания обычно измеряют с использованием анализов Biacore или Octet, как известно в данной области.

[00105] Под “родительским полипептидом” или “полипептидом-предшественником” (включая родительский Fc или Fc предшественники), как это используется в данном документе, подразумевается полипептид, который впоследствии модифицируют для получения варианта. Указанный родительский полипептид может представлять собой встречающийся в природе полипептид или вариант или сконструированный вариант встречающегося в природе полипептида. Исходный полипептид может относиться к самому полипептиду, композициям, которые содержат исходный полипептид, или к аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Соответственно, под родительским Fc полипептидом, как используется в данном



документе, подразумевается немодифицированный Fc полипептид, который модифицирован для получения варианта, и под родительским антителом, как используется в данном документе, подразумевается немодифицированное антитело, которое модифицировано для получения варианта антитела.

[00106] Под “положением”, используемым в данном описании, подразумевается местоположение в последовательности белка. Положения могут быть пронумерованы последовательно или в соответствии с установленным форматом, например, индексом ЕС для нумерации антител.

[00107] Используемый в данном документе термин “антиген-мишень/антиген-мишень” означает молекулу, которая специфически связана с варибельным участком данного антитела. Целевой антиген может представлять собой белок, углевод, липид или другое химическое соединение. Ряд подходящих типичных целевых антигенов описаны в данном документе.

[00108] Термин “клетка-мишень” в контексте данного описания обозначает клетку, которая экспрессирует антиген-мишень. Как правило, для целей изобретения клетки-мишени представляют собой либо опухолевые клетки, которые экспрессируют АМО, либо Т-клетки, которые экспрессируют антиген CD3.

[00109] Под “Fv” или “Fv-доменом” или “Fv-участком”, как используют в данном документе, подразумевается полипептид, который содержит домены VL и VH антигенсвязывающего домена, как правило, из антитела. Fv-домены обычно образуют антигенсвязывающий домен или АСД, как обсуждается в данном документе, если они содержат активные VH и VL домены (хотя в некоторых случаях используется Fv, содержащий ограничивающий линкер, так что активный АСД не образуется до разрезания). Как обсуждено ниже, Fv-домены могут быть организованы несколькими способами в данном изобретении и могут быть активными или неактивными, такими как в Формате scFv, Формате ограниченного Fv, Формате псевдо Fv и т.д. Следует понимать, что в данном изобретении в некоторых случаях Fv-домен состоит из VH и VL домена на одной полипептидной цепи, например, как продемонстрировано на Фиг. 1 и Фиг. 2, но с ограничивающим линкером таким образом, что внутримолекулярный АСД не может быть сформирован. В этих вариантах осуществления именно после разрезания образуются два активных АСД. В некоторых случаях Fv-домен состоит из VH и VL доменов, один из которых является инертным, так что только после разрезания образуется межмолекулярная АСД. Как обсуждено ниже, Fv-домены могут быть организованы несколькими способами в данном изобретении и могут быть «активными» или «неактивными», такими как в Формате scFv, ограниченном Формате Fv, псевдо Формате Fv и т.д. Кроме того, как обсуждалось в данном документе, Fv-домены, содержащие VH и VL, могут представлять собой/формировать АСД, и другие АСД, которые не содержат доменов VH и VL, могут быть сформированы с применением одАСД.

[00110] Под “варибельным доменом” в данном документе подразумевается участок иммуноглобулина, который содержит один или несколько Ig-доменов, по

существо кодируемых любым из генов  $V_k$ ,  $V_\lambda$  и/или  $V_H$ , которые составляют генетические локусы каппа, лямбда и тяжелой цепи иммуноглобулина соответственно, В некоторых случаях может использоваться один переменный домен, такой как  $sdF_v$  (также называемый в данном документе одАСД).

[00111] В вариантах осуществления, использующих как переменные тяжелые ( $V_H$ ), так и переменные легкие ( $V_L$ ) домены, каждый  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех гиперпеременных участков («определяющих комплементарность участков», «CDR») и четырех «каркасных участков» или «FR», расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Таким образом, домен  $V_H$  имеет структуру  $vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4$ , а домен  $V_L$  имеет структуру  $vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4$ . Как более полно описано в данном документе,  $vhFR$  участки и  $vlFR$  участки самостоятельно собираются с образованием  $F_v$ -доменов. В общем, в форматах пролекарств по данному изобретению существуют «ограниченные  $F_v$ -домены», в которых домены  $V_H$  и  $V_L$  не могут самоассоциироваться, и «псевдо  $F_v$ -домены», для которых CDR не образуют антигенсвязывающие домены при самоассоциировании.

[00112] Гиперпеременные участки придают антигенсвязывающую специфичность и, как правило, охватывают аминокислотные остатки примерно от аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1; «L» обозначает легкую цепь), 50-56 (LCDR2) и до 89-97 (LCDR3) в переменном участке легкой цепи и возле примерно 31-35B (HCDR1; «H» обозначает тяжелую цепь), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в переменном участке тяжелой цепи; Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) и/или остатки, образующие гиперпеременную петлю (например, остатки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3) в переменном участке легкой цепи и 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) и 96-101 (HCDR3) в переменном участке тяжелой цепи; Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Конкретные CDR по данному изобретению описаны ниже.

[00113] Как будет понятно специалистам в данной области техники, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться в разных системах нумерации. Однако следует понимать, что раскрытие последовательности переменной тяжелой и/или переменной легкой включает в себя раскрытие связанных (присущих) CDR. Соответственно, раскрытие каждого переменного тяжелого участка является раскрытием  $vhCDR$  (например,  $vhCDR1$ ,  $vhCDR2$  и  $vhCDR3$ ), а раскрытие каждого переменного легкого участка является раскрытием  $vlCDR$  (например,  $vlCDR1$ ,  $vlCDR2$  и  $vlCDR3$ ).

[00114] Полезное сравнение нумерации CDR приведено ниже, см. Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

**ТАБЛИЦА 1**

	Кабат + Чотиа	IMGT	Кабат	AbM	Чотиа	Контакт

vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

[00115] В данном описании система нумерации Кабата обычно используется для обозначения остатка в переменном домене (приблизительно, остатки 1-107 переменного участка легкой цепи и остатки 1-113 переменного участка тяжелой цепи) и нумерация системы ЕС для Fc-участков (например, Kabat et al., выше (1991)).

[00116] Данное изобретение обеспечивает большое количество различных наборов CDR. В этом случае «полный набор CDR» в контексте компонента против CD3 включает три переменных легких и три переменных тяжелых CDR, например, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3. Как будет понятно специалистам в данной области техники, каждый набор CDR, CDR VH и VL, может связываться с антигенами как индивидуально, так и в виде набора. Например, в ограниченных Fv-доменах vhCDR могут связываться, например, с CD3, а vlCDR могут связываться с CD3, но в ограниченном Формате они не могут связываться с CD3.

[00117] В контексте однодоменного АСД («одАСД»), который обычно используется в данном документе для связывания с антигенами-мишенями опухоли (АМО), набор CDR составляет только три CDR; иногда они также упоминаются в данной области как «VHH» домены.

[00118] Данные CDR могут быть частью большего переменного легкого или переменного тяжелого домена, соответственно. Кроме того, как более полно описано в данном документе, переменные тяжелые и переменные легкие домены могут находиться на отдельных полипептидных цепях или на одной полипептидной цепи в случае последовательностей scFv, в зависимости от формата и конфигурации фрагментов в данном документе.

[00119] CDR способствуют образованию антигенсвязывающих или, более конкретно, эпитоп-связывающих сайтов. «Эпитоп» относится к детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в переменных участках, известных как паратоп. Эпитопы представляют собой группы молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахара, и обычно имеют специфические структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Один антиген может иметь более одного эпитопа.

[00120] Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются

специфическим антигенсвязывающим пептидом; другими словами, аминокислотный остаток находится в зоне действия специфического антигенсвязывающего пептида.

[00121] Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. Конформационные и неконформационные эпитопы могут различаться тем, что связывание с первым, но не с последним, теряется в присутствии денатурирующих растворителей.

[00122] Эпитоп обычно включает, по меньшей мере, 3, а более обычно, по меньшей мере, 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп, могут быть проверены с помощью простого иммуноанализа, демонстрирующего способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с антигеном-мишенью, например «биннинг». Как указано ниже, данное изобретение включает в себя не только перечисленные антигенсвязывающие домены и антитела, но и те, которые конкурируют за связывание с эпитопами, связанными с перечисленными антигенсвязывающими доменами.

[00123] Вариабельные тяжелые и вариабельные легкие домены по данному изобретению могут быть “активными” или “неактивными”.

[00124] Как используется в данном документе, “неактивный VH” («iVH») и “неактивный VL” («iVL») относятся к компонентам псевдо Fv-домена, которые, в паре с их родственными партнерами VL или VH, соответственно, образуют результирующую пару VH/VL, которая специфично не связывается с антигеном, с которым активный VH или активный VL связывался бы, если бы он был связан с аналогичными VL или VH, которые не были бы неактивными. Типичные неактивные VH и неактивные VL домены образуются путем мутации последовательности VH или VL дикого типа, как более подробно описано ниже. Типичные мутации находятся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3 VH или VL. Типичная мутация включает размещение линкера домена в CDR2, тем самым образуя неактивный VH или неактивный VL домен. Напротив, активный VH или активный VL представляет собой тот, который после спаривания с его активным родственником партнером, т.е. VL или VH, соответственно, способен специфически связываться с его антигеном-мишенью. Таким образом, следует понимать, что псевдо Fv может быть парой VH/iVL, парой iVH/VL или парой iVH/iVL.

[00125] Напротив, используемый в данном документе термин “активный” относится к домену, связывающему CD3, который способен специфически связываться с CD3. Этот термин используется в двух контекстах: (а) при обращении к одному члену пары связывания Fv (т.е. VH или VL), которая имеет последовательность, способную к спариванию со своим родственником партнером и, в частности, к связыванию с CD3; и (б) при обращении к паре родственных (то есть, VH и VL) последовательностей, способной специфически связываться с CD3. Иллюстративная активная пара VH, VL или VH/VL

представляет собой последовательность дикого типа или родительскую последовательность.

[00126] “CD-х” относится к белкам кластера дифференцировки (CD). В иллюстративных вариантах осуществления CD-х выбран из тех белков CD, которые играют роль в рекрутировании или активации Т-клеток у субъекта, которому вводили полипептидную конструкцию по данному изобретению. В примерном варианте осуществления CD-х представляет собой CD3, последовательность которая продемонстрирована на Фиг.5.

[00127] Термин “связующий/связывающий домен” характеризует, в связи с данным изобретением, домен, который (специфически) связывается/взаимодействует с/распознает данный эпитоп-мишень или данный сайт-мишень на молекулах-мишенях (антигенах), например: EGFR и CD3 соответственно. Структура и функция антигенсвязывающего домена-мишени (распознающего EGFR) и, предпочтительно, также структура и/или функция домена, CD3-связывающего (распознающего CD3), основана/основаны на структуре и/или функции антитела например, полной или цельной молекулы иммуноглобулина, включая одАСД. В соответствии с данным изобретением антиген-мишеньсвязывающий домен обычно характеризуется наличием трех CDR, которые связывают антиген-мишень опухоли (обычно называемые в данной области как переменные тяжелые домены, хотя соответствующие CDR легкой цепи отсутствуют). Альтернативно, АСД к АМО могут включать три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 участки VL) и/или три CDR тяжелой цепи (то есть CDR1, CDR2 и CDR3 участки VH). Домен связывания CD3 предпочтительно также содержит, по меньшей мере, минимальные структурные требования к антителу, которые допускают связывание с мишенью. Более предпочтительно, CD3-связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 участки VL) и/или три CDR тяжелой цепи (то есть CDR1, CDR2 и CDR3 участки VH). Предполагается, что в иллюстративных вариантах осуществления антиген-мишень и/или CD3-связывающий домен получают или он может быть получен методами фагового дисплея или скрининга библиотеки.

[00128] Термин “домен”, используемый в данном документе, означает последовательность белка с функцией, как описано в данном документе. Домены по данному изобретению включают в себя домены связывающие антигены-мишени опухоли (АМО домены), переменные тяжелые домены, переменные легкие домены, линкерные домены и домены продления периода полураспада.

[00129] Под “линкером доменов” в данном документе подразумевается аминокислотная последовательность, которая соединяет два домена, как указано в данном документе. Линкеры доменов могут быть разрезаемыми линкерами, ограниченно разрезаемыми линкерами, неразрезаемыми линкерами, ограничивающими неразрезаемыми линкерами, линкерами scFv и т. д.

[00130] Под «разрезаемым линкером» («РЛ») в данном документе подразумевается аминокислотная последовательность, которая может разрезаться протеазой,

предпочтительно человеческой протеазой в потолгической ткани, как описано в данном документе. Разрезаемые линкеры обычно имеют длину по меньшей мере 3 аминокислоты, причем 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислот находят применение в данном изобретении, в зависимости от требуемую гибкость. Ряд разрезаемых линкерных последовательностей можно найти на Фиг. 6 и Фиг. 5.

[00131] Под “неразрезаемым линкером” («НРЛ») в данном документе подразумевается аминокислотная последовательность, которая не может разрезаться человеческой протеазой при нормальных физиологических условиях.

[00132] Под “ограничивающим разрезаемым линкером” («ОРЛ») в данном документе подразумевается короткий полипептид, который содержит сайт разрезания протеазой (как определено в данном документе), который соединяет два домена, как описано в данном документе, таким образом, что два домена не могут значительно взаимодействовать друг с другом до тех пор, пока они не находятся на разных полипептидных цепях, например, после разрезания. Когда ОРЛ присоединяется к домену VH и VL, как определено в данном документе, VH и VL не могут самостоятельно собираться с образованием функционального Fv до разрезания из-за стерических внутримолекулярных ограничений (хотя они могут собираться в псевдо Fv-домены в межмолекулярном соединении). После разрезания соответствующей протеазой VH и VL могут собираться с образованием активного антигенсвязывающего домена межмолекулярным путем. Как правило, ОРЛ имеют длину менее 10 аминокислот, причем 9, 8, 7, 6, 5 и 4 аминокислот находят применение в данном изобретении. В общем, сайты разрезания протеазой, как правило, имеют длину не менее 4+ аминокислот для придания достаточной специфичности, как продемонстрировано на Фиг. 6.

[00133] Под “ограничивающим неразрезаемым линкером” («ОНРЛ») в данном документе подразумевается короткий полипептид, который соединяет два домена, как описано в данном документе, таким образом, что два домена не могут значительно взаимодействовать друг с другом, и который не разрезается протеазами человека в значительной степени в физиологических условиях.

[00134] Под “ограниченным Fv-доменом” в данном документе подразумевается Fv-домен, который содержит активный переменный тяжелый домен и активный переменный легкий домен, ковалентно связанный с ограничивающим линкером, как описано в данном документе, таким образом, что активные тяжелый и легкий переменные домены не могут внутримолекулярно взаимодействовать с образованием активного Fv, который будет связывать антиген, такой как CD3. Таким образом, ограниченный Fv-домен представляет собой домен, который подобен scFv, но не способен связывать антиген из-за присутствия ограничивающего линкера (хотя они могут собираться внутримолекулярно с инертными переменными доменами с образованием псевдо Fv-доменов).

[00135] Под “псевдо Fv-доменом” в данном документе подразумевается домен, который содержит псевдо или неактивный переменный тяжелый домен или псевдо или

неактивный вариабельный легкий домен, или оба, связанные с помощью линкера доменов (который может быть разрезаемым, ограничивающим, неразрезаемым, неограничивающим и т.д.). Домены iVH и iVL псевдо Fv-домена не связываются с человеческим антигеном, либо когда связаны друг с другом (iVH/iVL), либо когда связаны с активным VH или VL; таким образом, Fv-домены iVH/iVL, iVH/VL и iVL/VH не связываются заметно с человеческим белком, так что эти домены инертны в организме человека.

[00136] Под “одноцепочечным Fv” или “scFv” в данном документе подразумевается вариабельный тяжелый домен (VH), ковалентно присоединенный к вариабельному легкому домену (VL), обычно с применением линкера доменов, как обсуждалось в данном документе, для образования scFv или scFv-домена. scFv-домен может иметь любую ориентацию от N к C-концу (VH-линкер-VL или VL-линкер-VH).

[00137] Под “однодоменным Fv”, “sdFv” или “одАСД” в данном документе подразумевается антигенсвязывающий домен, который имеет только три CDR, как правило, на основе технологии антител верблюдов. См.: Protein Engineering 9 (7): 1129-35 (1994); Rev Mol Biotech 74: 277-302 (2001); Ann Rev Biochem 82: 775-97 (2013). Как указано в данном документе, существует два основных типа одАСД, используемых в данном документе: одАСД, которые связываются с АМО и аннотируются как таковые (одАСД-АМО для общего термина, или одАСД-EGFR для того, который связывается с EGFR, одАСД-FOLR1 для того который связывается с FOLR1 и т. д.) и одАСД, которые связываются с ЧСА (“одАСД-ЧСА” или “одАСД (1/2)”).

[00138] Термин “сайт разрезания протеазой” относится к аминокислотной последовательности, распознаваемой и разрезаемой протеазой. Подходящие сайты разрезания протеазой обрисованы в общих чертах ниже и продемонстрированы на Фиг. 5 и Фиг. 6.

[00139] Используемый в данном документе термин “домен разрезания протеазой” относится к пептидной последовательности, включающей “сайт разрезания протеазой” и любые линкеры между отдельными сайтами разрезания протеазой и между сайтом (сайтами) разрезания протеазой и другими функциональными компонентами конструкций по данному изобретению (например, V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, iVH, iVL, домен(ы)-мишень(и) связывания антигена, домен продления периода полураспада и т. д.). Как указано в данном документе, домен разрезания протеазой может также включать дополнительные аминокислоты, если необходимо, например, для придания гибкости.

[00140] Термин “СОBRA™” и “условная биспецифическая перенаправленная активация” относится к биспецифическому условно эффективному белку, который имеет ряд функциональных белковых доменов. В некоторых вариантах осуществления один из функциональных доменов представляет собой антигенсвязывающий домен (АСД), который связывает антиген-мишень опухоли (АМО). В определенных вариантах осуществления другой домен представляет собой АСД, который связывается с антигеном Т-клеток при определенных условиях. Т-клеточный антиген включает, но не

ограничивается этим, CD3. Термин hemi-COBRA™ относится к условно-эффективному белку, который может связывать Т-клеточный антиген, в то время как переменная тяжелая цепь hemi-COBRA может ассоциироваться с переменной легкой цепью другой hemi-COBRA™ (комплементарная hemi-COBRA™) из-за присущей способности к самосборке при концентрации на поверхности клетки, экспрессирующей мишень.

Слитые белки по данному изобретению

[00141] Слитые белки по данному изобретению имеют ряд различных компонентов, обычно называемых в данном документе доменами, которые связаны друг с другом различными способами. Некоторые из доменов являются связывающими доменами, каждый из которых связывается с антигеном-мишенью (например, АМО или CD3). Поскольку они связываются с более чем одним антигеном, они упоминаются в данном документе как “мультиспецифичные”; например, пролекарственная конструкция по данному изобретению может связываться с АМО и CD3 и, таким образом, является “биспецифичной”. Белок также может иметь более высокую специфичность; например, если первый  $\alpha$ АМО связывается с EGFR, второй с ЕpСАМ и существует домен, связывающий анти-CD3, это будет “триспецифичная” молекула. Точно так же добавление анти-ЧСА-связывающего домена к этой конструкции сделало бы ее “тетраспецифичной”, как продемонстрировано на Фиг. 3В.

[00142] Как будет понятно специалистам в данной области, белки по данному изобретению могут иметь различную валентность, а также быть мультиспецифичными. То есть белки по данному изобретению могут связывать мишень с более чем одним сайтом связывания; например, Pго140 является двухвалентным для EGFR.

[00143] Белки по данному изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены CD3, расположенные различными способами, как описано в данном документе, антигенсвязывающие домены мишеней опухоли, домены продления периода полураспада, линкеры и т.д.

CD3 антигенсвязывающие домены

[00144] Специфичность ответа Т-клеток опосредуется распознаванием антигена (отображается в контексте главного комплекса гистосовместимости, ГКГС) рецепторным комплексом Т-клеток. Как часть рецепторного комплекса Т-клеток, CD3 представляет собой белковый комплекс, который содержит CD3 $\gamma$  (гамма) цепь, CD3 $\delta$  (дельта) цепь, две CD3 $\epsilon$  (эпсилон) цепи и две CD3 $\zeta$  (дзета) цепи, которые присутствуют на поверхности клетки. Молекулы CD3 связываются с  $\alpha$  (альфа) и  $\beta$  (бета) цепями Т-клеточного рецептора (ТКР), образуя ТКР комплекс. Кластеризация CD3 на Т-клетках, например с помощью Fv-доменов, которые связываются с CD3, приводит к активации Т-клеток, сходной с активацией Т-клеточного рецептора, но не зависящей от его клональной типичной специфичности.

[00145] Однако, как известно в данной области, активация CD3 может вызывать ряд токсических побочных эффектов, и, соответственно, данное изобретение направлено на обеспечение активного связывания CD3 полипептидов по данному изобретению только



в присутствии опухолевых клеток, где обнаруживаются специфические протеазы, которые затем расщепляют пролекарственные полипептиды по данному изобретению для обеспечения активного CD3-связывающего домена. Таким образом, в данном изобретении связывание Fv-домена анти-CD3 с CD3 регулируется доменом разрезания протеазой, который ограничивает связывание Fv-домена CD3 с CD3 только в микросреде патологической клетки или ткани с повышенным уровнем протеаз, например, в микроокружении опухоли, как описано в данном документе.

[00146] Соответственно, данное изобретение предоставляет два набора доменов VH и VL, активный набор (VH и VL) и неактивный набор (iVH и iVL), причем все четыре присутствуют в конструкции пролекарства. Конструкция отформатирована таким образом, что набор VH и VL не может самостоятельно ассоциироваться, а скорее ассоциируется с неактивным партнером, например, iVH и VL и iVL и VH, как продемонстрировано в данном документе.

#### 1. Активные анти-CD3 переменные тяжелые и переменные легкие домены

[00147] Существует ряд подходящих активных наборов CDR и/или доменов VH и VL, которые известны в данной области и находят применение в данном изобретении. Например, домены CDR и/или VH и VL получают из известных антител против CD3, таких как, например, муромонаб-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), висилизумаб (Nuvion), SP34 или I2C, TR-66 или X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, ОКТ3D, M-T301, SMC2, F101.01, UCNT-1 и WT-31.

[00148] В одном варианте осуществления последовательности VH и VL, которые образуют активный Fv-домен, который связывается с CD3 человека, продемонстрированы на Фиг. 5. Как продемонстрировано в данном документе, эти активные VH («aVH») и активные VL («aVL») домены могут использоваться в различных конфигурациях и Форматах 1, 2, 3 и 4.

#### 2. Неактивные переменные тяжелые и переменные легкие домены против CD3

[00149] Неактивные домены iVH и iVL содержат “обычные” каркасные участки (FR), которые разрешают ассоциацию, так что неактивный переменный домен будет ассоциироваться с активным переменным доменом, делая пару неактивной, например, неспособной связывать CD3.

[00150] Как будет понятно специалистам в данной области, существует ряд “неактивных” переменных доменов, которые находят применение в данном изобретении. По существу, можно использовать любой переменный домен с каркасными участками человека, который позволяет самосборку с другим переменным доменом, независимо от того, какие аминокислоты находятся в положении CDR в переменном участке. Для ясности говорят, что неактивные домены содержат CDR, хотя технически неактивные переменные домены не предоставляют возможности связывания.

[00151] Как будет понятно в данной области техники, обычно просто генерируют

неактивные домены VH или VL, и это может быть сделано различными способами. В некоторых вариантах осуществления генерация неактивных переменных доменов обычно осуществляется путем изменения одного или нескольких CDR активного Fv, включая внесение изменений в один или несколько из трех CDR активного переменного домена. Это можно сделать, сделав одну или несколько аминокислотных замен в функционально важных остатках в одной или нескольких CDR, заменив некоторые или все остатки CDR случайными последовательностями, заменив одну или несколько CDR метками или последовательностями flag и/или поменяв местами CDR и/или переменные участки с таковыми из нерелевантного антитела (например, того, которое направлено на белок другого организма).

[00152] В некоторых случаях только один из CDR в переменном участке может быть изменен, чтобы сделать его неактивным, хотя другие варианты осуществления включают в себя изменения в одном, двух, трех, четырех, пяти или шести CDR.

[00153] В некоторых случаях неактивные домены могут быть спроектированы для стимулирования селективного связывания в Формате пролекарства, чтобы стимулировать образование внутримолекулярных доменов iVH-VL и VH-iVL перед разрезанием (например, через образование межмолекулярных пар). См., например, Igawa et al., Protein Eng. Des. Selection 23 (8): 667-677 (2010), которая включена в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте, и конкретно для аминокислотных замен остатка на поверхности взаимодействия.

[00154] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен полипептидных конструкций, описанных в данном документе, проявляет не только сильное сродство к CD3-связыванию с человеческим CD3, но также демонстрирует превосходную перекрестную реактивность с соответствующими белками CD3 обезьяны яванского макака (*Cynomolgus*). В некоторых случаях CD3-связывающий домен полипептидных конструкций перекрестно реактивен с CD3 от обезьяны яванского макака. В некоторых случаях отношения KD человек:яванский макак к CD3 составляют от 5 до 0,2.

[00155] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен антигенсвязывающего белка может быть любым доменом, который связывается с CD3, включая, но не ограничиваясь, домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. В некоторых случаях полезно, чтобы CD3-связывающий домен происходил из того же вида, в котором в конечном итоге будет использоваться антигенсвязывающий белок. Например, для использования у людей может быть полезным, чтобы CD3-связывающий домен антигенсвязывающего белка содержал человеческие или гуманизированные остатки из антигенсвязывающего домена антитела или фрагмента антитела.

[00156] Таким образом, в одном аспекте антигенсвязывающий домен содержит гуманизированный или человеческий связывающий домен. В одном варианте

осуществления гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит одну или несколько (например, все три) участок 1, определяющий комплементарность, легкой цепи (CDR1 LC), участок 2, определяющий комплементарность, легкой цепи (CDR2 LC), и участок 3, определяющий комплементарность, легкой цепи (CDR3 LC) гуманизованного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в данном документе, и/или один или несколько (например, все три) участок 1, определяющий комплементарность, тяжелой цепи, (CDR1 HC), участок 2, определяющий комплементарность, тяжелой цепи, (CDR2 HC) и участок 3, определяющий комплементарность, тяжелой цепи, (CDR3 HC) гуманизованного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, описанного в данном документе, например, гуманизованного или человеческого анти-CD3-связывающего домена, содержащего один или несколько например, все три, CDR LC и один или более, например, все три, CDR HC.

[00157] В некоторых вариантах осуществления гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит вариабельный участок гуманизованной или легкой цепи человека, специфичный к CD3, при этом вариабельный участок легкой цепи, специфичный к CD3, включает CDR легкой цепи человека или не человека в каркасном участке легкой цепи человека. В некоторых случаях каркасный участок легкой цепи представляет собой каркас легкой цепи (лямбда). В других случаях каркасный участок легкой цепи представляет собой каркас легкой цепи (каппа).

[00158] В некоторых вариантах осуществления один или несколько CD3-связывающих доменов являются гуманизованными или полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления один или несколько активированных CD3-связывающих доменов имеют KD связывания 1000 нМ или менее с CD3 на клетках, экспрессирующих CD3. В некоторых вариантах осуществления один или несколько активированных CD3-связывающих доменов имеют связывание KD 100 нМ или менее с CD3 на клетках, экспрессирующих CD3. В некоторых вариантах осуществления один или несколько активированных CD3-связывающих доменов имеют KD связывания 10 нМ или менее с CD3 на клетках, экспрессирующих CD3. В некоторых вариантах осуществления один или несколько CD3-связывающих доменов обладают перекрестной реактивностью с CD3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления один или несколько CD3-связывающих доменов содержат аминокислотную последовательность, представленную в данном документе.

[00159] В некоторых вариантах осуществления гуманизованный или человеческий анти-CD3-связывающий домен содержит гуманизованную или человеческий вариабельный участок тяжелой цепи, специфичный к CD3, при этом вариабельный участок тяжелой цепи, специфичный к CD3, включает CDR тяжелой цепи человека или не человека в каркасном участке тяжелой цепи человека.

[00160] В одном варианте осуществления анти-CD3-связывающий домен, представляет собой Fv, содержащий легкую цепь и тяжелую цепь аминокислотной

последовательности, представленной в данном документе. В одном варианте осуществления анти-CD3-связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замены) аминокислотной последовательности переменного участка легкой цепи, представленной в данном документе, или последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в данном документе; и/или переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 30, 20 или 10 модификаций (например, замены) аминокислотной последовательности переменного участка тяжелой цепи, представленной в данном документе, или последовательности с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью, представленной в данном документе. В одном варианте осуществления гуманизированный или человеческий анти-CD3-связывающий домен представляет собой scFv, и переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, присоединяется к переменному участку тяжелой цепи, содержащему аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, посредством scFv линкера. Переменный участок легкой цепи и переменный участок тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: переменный участок легкой цепи - scFv линкер - переменный участок тяжелой цепи или переменный участок тяжелой цепи - scFv линкер - переменный участок легкой цепи.

[00161] В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен антигенсвязывающего белка имеет сродство к CD3 на клетках, экспрессирующих CD3, с KD 1000 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающий домен антигенсвязывающего белка имеет сродство к CD3ε с KD 1000 нМ или менее, 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. В дополнительных вариантах осуществления CD3-связывающий домен антигенсвязывающего белка имеет низкое сродство к CD3, т.е. около 100 нМ или более.

[00162] Сродство к связыванию с CD3 может быть определено, например, по способности самого антигенсвязывающего белка или его CD3-связывающего домена связываться с CD3, нанесенным на планшет для анализа; представленным на поверхности микробной клетки; в растворе; и т.д., как известно в данной области, обычно с использованием анализов Biacore или Octet. Активность связывания самого антигенсвязывающего белка, или его CD3-связывающего домена по данному изобретению, с CD3 можно анализировать путем иммобилизации лиганда (например, CD3) или самого антигенсвязывающего белка или его CD3-связывающего домена на грануле, подложке, клетке и т.д. Агенты могут быть добавлены в соответствующий буфер,

а партнеры по связыванию могут инкубироваться в течение некоторого времени при данной температуре. После промывки для удаления несвязанного материала связанный белок может высвободиться, например, с помощью SDS, буферов с высоким pH и т.п., и анализироваться, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[00163] Во многих вариантах предпочтительными активными и инертными связывающими доменами являются те, которые продемонстрированы на Фиг.5.

Антигенсвязывающие домены направленные на антигены-мишени опухолей

[00164] В дополнение к описанным CD3 и доменам продления периода полураспада полипептидные конструкции, описанные в данном документе, также содержат нацеливающих доменов, которые связываются с одним или несколькими антигенами-мишенями или одним или несколькими участками на одном антигене-мишени. В данном документе предполагается, что полипептидная конструкция по данному изобретению разрезается, например, в специфической для заболевания микросреде или в крови субъекта в домене разрезания протеазой, и что каждый антигенсвязывающий целевой домен будет связываться с антигеном-мишенью на клетке-мишени, тем самым активируя CD3-связывающий домен для связывания Т-клетки. Как правило, АМО-связывающие домены могут связываться со своими мишенями до разрезания протеазой, поэтому они могут “ждать” активации на клетке-мишени, в качестве ловушки для Т клеток. По меньшей мере, один антиген-мишень вовлечен в и/или связан с заболеванием, расстройством или состоянием. Типичные антигены-мишени включают антигены, связанные с пролиферативным заболеванием, опухолевым заболеванием, воспалительным заболеванием, иммунологическим расстройством, аутоиммунным заболеванием, инфекционным заболеванием, вирусным заболеванием, аллергической реакцией, паразитарной реакцией, болезнью трансплантат против хозяина или болезнь хозяин против трансплантата. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевый антиген, экспрессированный на опухолевой клетке. Альтернативно в некоторых вариантах осуществления антиген-мишень связан с патогеном, таким как вирус или бактерия. По меньшей мере, один антиген-мишень также может быть направлен против здоровой ткани.

[00165] В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой молекулу клеточной поверхности, такую как белок, липид или полисахарид. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой опухолевую клетку, вирусно-инфицированную клетку, бактериально инфицированную клетку, поврежденный эритроцит, клетку артериальной бляшки или клетку фиброзной ткани.

[00166] Предпочтительные варианты осуществления изобретения используют одАСД в качестве нацеливающих доменов. Они предпочтительны по сравнению с scFv АСД, поскольку добавление других доменов VH и VL в конструкцию по данному изобретению может осложнить образование псевдо Fv доменов.

[00167] В некоторых вариантах осуществления в конструкциях пролекарств по данному изобретению используется один АМО-связывающий домен, обычно такой как

изображен на Фиг. 3А, в виде пар одАСД-АМО, и на Фиг. 4, в конфигурации "Формата 4". На Фиг. 4 продемонстрировано использование одного АСД против EGFR, хотя можно использовать и другие АМО-связывающие домены.

[00168] В некоторых вариантах осуществления, особенно в конструкциях Формата 1 и Формата 2, в конструкциях пролекарства по данному изобретению применяются два АСД АМО, опять же предпочтительно в Формате одАСД-АМО. При использовании доменов двойного нацеливания они могут связываться с одним и тем же эпитопом одного и того же АМО. Например, как обсуждено в данном документе, многие из конструкций в данном документе используют два идентичных нацеливающих домена. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы два нацеливающих домена, которые связываются с разными эпитопами одной и той же АМО, например, как продемонстрировано на Фиг. 5, два одАСД EGFR связываются с разными эпитопами на EGFR человека. В некоторых вариантах осуществления два нацеливающих домена связываются с различными АМО, см., например, Фиг. 55.

[00169] Рассматриваемые в данном документе полипептидные конструкции содержат, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, при этом указанный антигенсвязывающий домен связывается, по меньшей мере, с одним антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены-мишени специфически связываются с молекулой клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены-мишени специфически связываются с опухолевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления домены, связывающие антиген-мишень, специфически и независимо связываются с антигеном-мишенью опухоли («АМО»), выбранным по меньшей мере из одного из ЕpСАМ, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, LyPD3, B7H3, СЕА и FOLR1.

[00170] Особое применение в данном изобретении представляют собой одАСД для EGFR человека, как продемонстрировано на Фиг.5.

[00171] Дополнительные варианты применения в данном изобретении представляют собой одАСД для FOLR1 человека, как продемонстрировано на Фиг.5.

[00172] Дальнейшие варианты применения в данном изобретении представляют собой одАСД для человеческого B7H3, как продемонстрировано на Фиг.5.

[00173] Дополнительные варианты применения в данном изобретении представляют собой одАСД для человеческого ЕpСАМ, как продемонстрировано на Фиг.5.

[00174] В некоторых вариантах осуществления белок до разрезания домена разрезания протеазой составляет менее чем приблизительно 100 кДа. В некоторых вариантах осуществления белок после разрезания домена разрезания протеазой составляет от около 25 до около 75 кДа. В некоторых вариантах осуществления белок до разрезания протеазой имеет размер, который выше почечного порога для клиренса первого прохода. В некоторых вариантах осуществления белок до разрезания протеазой имеет период полувыведения, по меньшей мере, около 50 часов. В некоторых вариантах осуществления

белок до разрезания протеазой имеет период полувыведения, по меньшей мере, приблизительно 100 часов. В некоторых вариантах осуществления белок имеет повышенное проникновение в ткани по сравнению с IgG к тому же антигену-мишени. В некоторых вариантах осуществления белок имеет повышенное распределение в ткани по сравнению с IgG к тому же антигену-мишени.

Домены продления периода полураспада

[00175] МСЕ белки по данному изобретению (опять же, также называемые в данном документе белками или конструкциями «COBRA™») необязательно содержат домены продления периода полураспада. Предполагается, что такие домены включают, но не ограничиваются ими, ЧСА-связывающие домены, Fc-домены, малые молекулы и другие домены удлинения периода полураспада, известные в данной области.

[00176] Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (молекулярная масса ~ 67 кДа) является наиболее распространенным белком в плазме, присутствует в концентрации около 50 мг/мл (600 мкМ) и имеет период полураспада у людей около 20 дней. ЧСА служит для поддержания рН в плазме, способствует коллоидному кровяному давлению, выполняет функцию переносчика многих метаболитов и жирных кислот и служит основным транспортным белком для лекарств в плазме.

[00177] Нековалентная ассоциация с альбумином продлевает период полувыведения короткоживущих белков. Например, рекомбинантное слияние альбумин-связывающего домена с фрагментом Fab приводило к снижению клиренса *in vivo* в 25 и 58 раз и продлению периода полураспада в 26 и 37 раз при внутривенном введении мышам и кроликам соответственно по сравнению с введением только одного Fab фрагмента. В другом примере, когда инсулин ацилируют жирными кислотами для стимуляции ассоциации с альбумином, наблюдается длительный эффект при подкожной инъекции кроликам или свиньям. Вместе эти исследования демонстрируют связь между связыванием альбумина и пролонгированным действием.

[00178] В одном аспекте антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, содержат домен продления периода полураспада, например домен, который специфически связывается с ЧСА. В других вариантах осуществления ЧСА-связывающий домен представляет собой пептид. В других вариантах осуществления ЧСА-связывающий домен представляет собой малую молекулу. Предполагается, что ЧСА-связывающий домен антигенсвязывающего белка является довольно небольшим и имеет не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа в некоторых вариантах осуществления. В некоторых случаях ЧСА-связывающий домен составляет 5 кДа или менее, если он представляет собой пептид или малую молекулу.

[00179] Во многих вариантах домен продления периода полураспада представляет собой однодоменный антигенсвязывающий домен из однодоменного антитела, которое связывается с ЧСА. Этот домен обычно называют в данном документе «одАСД» для ЧСА человека (одАСД-ЧСА) или, альтернативно, «одАСД (1/2)», чтобы отличать эти связывающие домены от одАСД для АМО. Особенно полезный одАСД (1/2)

продемонстрирован на Фиг. 5.

[00180] Домен продления периода полураспада антигенсвязывающего белка обеспечивает измененную фармакодинамику и фармакокинетику самого антигенсвязывающего белка. Как указано выше, домен продления периода продлевает время полувыведения. Домен продления периода полураспада также изменяет фармакодинамические свойства, включая изменение распределения ткани, проникновение и диффузию антигенсвязывающего белка. В некоторых вариантах осуществления домен продления периода полураспада обеспечивает улучшенное нацеливание на ткань (включая опухоль), проникновение в ткань, распределение в ткани, диффузию внутри ткани и повышенную эффективность по сравнению с белком без связывающего домена с продленным периодом полураспада. В одном варианте осуществления в терапевтических способах эффективно и продуктивно используется уменьшенное количество антигенсвязывающего белка, что приводит к уменьшенным побочным эффектам, таким как пониженная цитотоксичность неопухолевых клеток.

[00181] Кроме того, характеристики домена продления периода полураспада, например, ЧСА-связывающего домена, включают средство связывания ЧСА-связывающего домена к ЧСА. Аффинность указанного ЧСА-связывающего домена может быть выбрана так, чтобы нацеливаться на специфическое время полувыведения в конкретной полипептидной конструкции. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ЧСА-связывающий домен обладает высокой аффинностью связывания. В других вариантах осуществления ЧСА-связывающий домен обладает средней аффинностью связывания. В еще других вариантах осуществления ЧСА-связывающий домен имеет низкую или незначительную аффинность связывания. Типичные аффинности связывания включают концентрации КD при 10 нМ или менее (высокая), от 10 нМ до 100 нМ (средняя) и более 100 нМ (низкая). Как указано выше, аффинность связывания с ЧСА определяют известными способами, такими как поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

#### Сайты разрезания протеазой

[00182] Белковые композиции по данному изобретению и, в частности, пролекарственные конструкции, содержат один или несколько сайтов разрезания протеазой, обычно присутствующих в разрезаемых линкерах, как описано в данном документе.

[00183] Как описано в данном документе, пролекарственные конструкции по данному изобретению содержат, по меньшей мере, один сайт разрезания протеазой, содержащий аминокислотную последовательность, которая разрезается, по меньшей мере, одной протеазой. В некоторых случаях описанные в данном документе МСЕ белки содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или более сайтов разрезания протеазой, которые разрезаются по меньшей мере одной протеазой. Как более полно обсуждается в данном документе, когда в конструкции пролекарства используется более одного сайта разрезания протеазой, они могут быть одинаковыми (например,



множественные сайты, разрезаемые одной протеазой) или разными (два или более сайтов разрезания разрезаются минимум двумя разными протеазами). Как будет понятно специалистам в данной области, конструкции, содержащие три или более сайтов разрезания протеазой, могут использовать один, два, три и т.д.; например, некоторые конструкции могут использовать три сайта для двух разных протеаз и т. д.

[00184] Аминокислотная последовательность сайта разрезания протеазой будет зависеть от целевой протеазы. Как известно в данной области, существует ряд человеческих протеаз, которые обнаруживаются в организме и могут быть связаны с болезненными состояниями.

[00185] Известно, что протеазы секретируются некоторыми больными клетками и тканями, например опухолевыми или раковыми клетками, создавая микроокружение, богатое протеазами, или богатое протеазами микроокружение. В некоторых случаях кровь субъекта богата протеазами. В некоторых случаях клетки, окружающие опухоль, выделяют протеазы в микроокружение опухоли. Клетки, окружающие опухоль, секретирующие протеазы, включают, но не ограничиваются ими, стромальные клетки опухоли, миофибробласты, клетки крови, тучные клетки, В-клетки, НК-клетки, регуляторные Т-клетки, макрофаги, цитотоксические Т-лимфоциты, дендритные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, полиморфно-ядерные клетки и другие клетки. В некоторых случаях протеазы присутствуют в крови субъекта, например протеазы, которые нацелены на аминокислотные последовательности, обнаруженные в микробных пептидах. Эта особенность позволяет нацеленным терапевтическим средствам, таким как антигенсвязывающие белки, обладать дополнительной специфичностью, поскольку Т-клетки не будут связаны антигенсвязывающим белком, кроме как в богатой протеазой микроокружении целевых клеток или тканей.

[00186] Протеазы - это белки, которые расщепляют белки, в некоторых случаях специфичным для последовательности образом. Протеазы включают, но не ограничиваются ими, сериновые протеазы, цистеиновые протеазы, аспарат-протеазы, треониновые протеазы, глутаминовые протеазы, металлопротеазы, аспарагиновые пептидные лиазы, сывороточные протеазы, катепсины (например, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин К, Катепсин L, Катепсин S), калликреины, hK1, hK10, hK15, KLK7, ГранзимВ, плазмин, коллагеназу, коллагеназу IV типа, стромелизин, фактор Ха, химотрипсиноподобную протеазу, трипсиноподобную протеазу, эластазоподобную протеазу, субтилизин, актинидин, бромелайн, кальпаин, каспазы (например, каспаза-3), Mir1-CP, папаин, ВИЧ-1-протеазу, HSV-протеазу, CMV-протеазу, химозин, ренин, пепсин, матриптазу, легумаин, плазмепсин, непентезин, металлоэкзопептидазы, металлоэндопептидазы, матричные металлопротеазы (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP11, MMP14, меприн, урокиназный активатор плазминогена (УАП), энтерокиназу, простат-специфический антиген (PSA, hK3), интерлейкин-1 $\beta$ -превращающий фермент, тромбин, ФАП (ФАП- $\alpha$ ), дипептидилпептидазу и дипептидилпептидазу IV (DPP-IV/CD26).

[00187] Некоторые подходящие протеазы и последовательности разрезания протеазами продемонстрированы на Фиг. 5 и Фиг. 6.

#### Линкеры

[00188] Как обсуждается в данном документе, различные домены по данному изобретению, как правило, связаны друг с другом с применением аминокислотных линкеров, которые также могут придавать функциональность, включая гибкость или негибкость (например, стерическое ограничение), а также способность разрезаться с применением протеазы *in situ*. Данные линкеры могут быть классифицированы несколькими способами.

[00189] Данное изобретение обеспечивает “линкеры доменов”, которые применяются для соединения двух или более доменов (например, VH и VL, домена, связывающих опухолевый антиген-мишень (АСД АМО, иногда также упоминаемого в данном документе как «αАМО (для» анти-АМО »)) с VH или VL, домена продления периода полураспада к другому компоненту и т. д. Например, линкеры доменов могут быть неразрезаемыми (НРЛ), разрезаемыми («РЛ»), ограничивающими и разрезаемыми (ОРЛ) и ограничивающими и неразрезаемыми (ОНРЛ).

#### 1. Неразрезаемые линкеры

[00190] В некоторых вариантах осуществления линкер доменов не разрезается. Как правило, они могут быть одного из двух типов: неразрезаемыми и гибкими, что позволяет компонентам “выше” и “ниже” линкера в конструкциях внутримолекулярно самостоятельно собираться определенными способами; или неразрезаемыми и ограничивающими, в которых два компонента, разделенных линкером, не способны к внутримолекулярной самосборке. Следует отметить, однако, что в последнем случае, хотя два домена-компонента, которые разделены неразрезаемым ограничивающим линкером, не самоорганизуются внутримолекулярно, другие внутримолекулярные компоненты будут самоорганизовываться с образованием псевдо Fv доменов.

#### Неразрезаемые, но гибкие линкеры

[00191] В данном варианте осуществления линкер используется для объединения доменов, чтобы сохранить функциональность доменов, как правило, посредством более длинных гибких доменов, которые не разрезаются протеазами *in situ* у пациента. Примеры внутренних неразрезаемых линкеров, подходящих для связывания доменов в полипептидах по данному изобретению, включают, но не ограничиваются ими, (GS)<sub>n</sub>, (GGS)<sub>n</sub>, (GGGS)<sub>n</sub>, (GGSG)<sub>n</sub>, (GGSGG)<sub>n</sub>, или (GGGGS)<sub>n</sub>, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах длина линкера может составлять около 15 аминокислот.

#### Неразрезаемые и ограничивающие линкеры

[00192] В некоторых случаях линкеры не содержат сайт разрезания и также являются слишком короткими, чтобы позволить белковым доменам, разделенным линкером, внутримолекулярную самоорганизацию и являются “и ограничивающими неразрезаемыми линкерами” или “ОНРЛ”. Например, в Pro186 активный VH и активный VL разделены 8 аминокислотами (“8-мер”), что не позволяет VH и VL самостоятельно

собираться в активный антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления линкер все еще является гибким; например, (GGGS)<sub>n</sub>, где n=2. В других вариантах осуществления, хотя обычно они менее предпочтительны, могут использоваться более жесткие линкеры, такие как те, которые включают пролин или объемные аминокислоты.

## 2. Разрезаемые линкеры

[00193] Все пролекарственные конструкции в данном документе содержат, по меньшей мере, один разрезаемый линкер. Таким образом, в одном варианте осуществления линкер доменов является разрезаемым (РЛ), и иногда упоминается в данном документе как “домен разрезания протеазой” (“ДРП”). В данном варианте осуществления РЛ содержит сайт разрезания протеазой, как описано в данном документе и изображено на Фиг. 5 и Фиг. 6. В некоторых случаях РЛ содержит только сайт разрезания протеазой. Необязательно, в зависимости от длины сайта распознавания и разрезания, может быть несколько дополнительных связывающих аминокислот на одном или обоих N- или C-конце РЛ; например, может быть от 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот на одном или обоих N- и C-концах сайта разрезания. Таким образом, разрезаемые линкеры также могут быть ограничивающими (например, 8-мерными) или гибкими.

[00194] Особый интерес в данном изобретении представляют разрезаемые линкеры MMP9 и разрезаемые меприном линкеры, в частности разрезаемые линкеры, связанные с MMP9, и разрезаемые линкеры, связанные с меприном.

### Домены по данному изобретению

[00195] Данное изобретение обеспечивает ряд различных форматов пролекарственных полипептидов по данному изобретению. Данное изобретение предоставляет ограниченные Fv-домены и ограниченные псевдо Fv-домены. Кроме того, данное изобретение предлагает многовалентные условно-эффективные (“МСЕ”) белки, которые содержат два Fv-домена, но являются неизомеризующимися конструкциями. Как указано в данном документе, это могут быть неизомеризующиеся разрезаемые форматы или неизомеризующиеся неразрезаемые форматы, хотя каждая конструкция содержит по меньшей мере один домен разрезания протеазой.

[00196] Важно отметить, что хотя оба этих домена (Fv-домен и псевдо Fv-домен) упоминаются в данном документе как “ограниченные”, это означает, что, как обсуждалось выше и продемонстрировано на Фиг. 37, Фиг. 38 и Фиг. 39 только один из них должен быть ограниченным, хотя обычно, когда оба линкера ограничивающие, белок имеет лучшую экспрессию.

[00197] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что для Форматов 1, 2 и 4 существует четыре возможности для порядка от N- к C-концу ограниченных и псевдо Fv-доменов по данному изобретению (линкеры не продемонстрированы): aVH-aVL и iVL-iVH, aVH-aVL и iVH-iVL, aVL-aVH и iVL-iVH, aVL-aVH и iVH-iVL. Все четыре были протестированы, и все четыре имеют активность, хотя первый порядок, aVH-aVL и iVL-iVH, демонстрирует лучшую экспрессию, чем

остальные три. Таким образом, хотя описание в данном документе, как правило, продемонстрировано в Формате aVH-aVL и iVL-iVH, все раскрытия в данном документе включают в себя и другие порядки для этих доменов.

[00198] Следует отметить, что обычно порядок от N- к С-концу для полноразмерных конструкций согласно данному изобретению основан на ориентации aVH-aVL и iVL-iVH.

[00199] Кроме того, в данной области техники известно, что у людей может быть иммуногенность, происходящая от С-концевых последовательностей определенных АСД. Соответственно, в целом, в частности, когда С-конец конструкций заканчивается в одАСД (например, домены одАСД-ЧСА многих конструкций), можно использовать гистидиновый тэг (His6 или His10). Многие или большинство последовательностей в данном документе были получены с применением His6 С-концевых тэгов по причинам очистки, но эти последовательности также можно использовать для снижения иммуногенности у людей, как продемонстрировано в Holland et al., DOI 10.1007/s10875-013-9915-0 и WO2013/024059.

#### Ограниченные Fv-домены

[00200] Данное изобретение обеспечивает ограниченные Fv-домены, которые содержат активный VH и активный VL-домен, которые ковалентно присоединены с применением ограничивающего линкера (который, как указано в данном документе, может быть разрезаемым (форматы 1 и 3) или неразрезаемым (форматы 2 и 4)). Ограничивающий линкер предотвращает внутримолекулярную ассоциацию между aVH и aVL в отсутствие разрезания. Таким образом, ограниченный Fv-домен обычно содержит набор из шести CDR, содержащихся в переменных доменах, при этом vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3 VH связывают CD3 человека, и vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3 VL связывают CD3 человека, но в Формате пролекарства (например, неразрезанного) VH и VL неспособны стерически ассоциироваться с образованием активного связывающего домена, предпочитая вместо этого соединяться внутримолекулярно с псевдо Fv.

[00201] Ограниченные Fv-домены могут содержать активный VH и активный VL (aVH и aVL) или неактивные VH и VL (iVH и iVL, и в этом случае это ограниченный псевдо Fv-домен) или их комбинации, как описано в данном документе.

[00202] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL в ограниченном Fv-доме может быть (от N- к С-концу) либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер-VH.

[00203] Как указано в данном документе, для конструкций Формата 1 ограниченные Fv-домены могут содержать VH и VL, связанные с применением разрезаемого линкера, в случаях, таких как продемонстрированные на Фиг. 5 и Фиг. 6. В данном варианте осуществления ограниченный Fv-домен имеет структуру (от N- к С-концу) vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4-ОПЛ-vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4. Как правило, ограниченный Fv-домен содержит активные домены VH и VL (например, способен связывать CD3, когда он ассоциирован) и, таким

образом, имеет структуру (от N- к С-концу) vhFR1-avhCDR1-vhFR2-avhCDR2-vhFR3-avhCDR3-vhFR4-ОПЛ-vlFR1-avlCDR1-vlFR2-avlCDR2-vlFR3-avlCDR3-vlFR4.

[00204] Как описано в данном документе, для конструкций Формата 2 ограниченные Fv-домены могут содержать VH и VL, связанные с применением неразрезаемого линкера. В данном варианте осуществления ограниченный Fv-домен имеет структуру (от N- к С-концу) vhFR1-vhCDR1-vhFR2-vhCDR2-vhFR3-vhCDR3-vhFR4-ОПЛ-vlFR1-vlCDR1-vlFR2-vlCDR2-vlFR3-vlCDR3-vlFR4. Как правило, ограниченный Fv-домен содержит активные домены VH и VL (например, способен связываться с CD3, когда он ассоциирован) и, таким образом, имеет структуру (от N- к С-концу) vhFR1-avhCDR1-vhFR2-avhCDR2-vhFR3-avhCDR3-vhFR4-ОПЛ-vlFR1-avlCDR1-vlFR2-avlCDR2-vlFR3-avlCDR3-vlFR4.

[00205] Особое применение в данном изобретении имеют ограничивающие неразрезаемые Fv-домены, имеющие aVH, имеющий SEQ ID NO: 61, aVL, имеющий SEQ ID NO: 49, и линкер доменов, имеющий SEQ ID NO: 74.

#### Ограниченные псевдо Fv-домены

[00206] Данное изобретение обеспечивает ограниченные псевдо Fv-домены, содержащие неактивные или псевдо iVH- и iVL-домены, которые ковалентно связаны с применением ограничивающего линкера (который, как указано в данном документе, может быть разрезаемым или неразрезаемым). Ограничивающий линкер предотвращает внутримолекулярную ассоциацию между iVH и iVL в отсутствие разрезания. Таким образом, общий ограниченный псевдо Fv-домен включает в себя iVH и iVL с каркасными участками, которые допускают ассоциацию (в неограниченном Формате) iVH и iVL, хотя результирующий псевдо Fv-домен не связывается с человеческим белком. Домены iVH могут собираться с доменами aVL, а домены iVL могут собираться с доменами aVH, хотя полученные структуры не связываются с CD3.

[00207] Ограниченные псевдо Fv-домены содержат неактивные VH и VL (iVH и iVL).

[00208] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL в ограниченном псевдо Fv-доме может быть либо (От N- к С-концу) VH-линкер-VL, либо VL-линкер-VH.

[00209] Как указано в данном документе, ограниченные псевдо Fv-домены могут содержать iVH и iVL, связанные с применением неразрезаемого линкера, как продемонстрировано в Форматах 1, 2 и 4, или с разрезаемыми линкерами, как продемонстрировано в Формате 3.

[00210] Как правило, ограниченный Fv-домен содержит инертные домены VH и VL (например, спосные связывать CD3, когда они ассоциированы) и, таким образом, имеет структуру (от N- к С-концу) vhFR1-ivlCDR1-vhFR2-ivlCDR2-vhFR3-ivlCDR3-vhFR4-ОПЛ-ivlFR1-ivhCDR1-ivlFR2-ivhCDR2-ivlFR3-ivhCDR3-ivlFR4.

[00211] Особое применение в данном изобретении имеют ограниченные неразрезаемые псевдо Fv-домены, имеющие iVH, имеющий SEQ ID NO: 65 или SEQ ID

NO: 69, iVL, имеющий SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 57, и линкер доменов имеющий SEQ ID NO: 74.

#### Форматы по данному изобретению

Как обсуждалось в данном документе, пролекарственные конструкции по данному изобретению могут принимать ряд различных форматов, включая разрезаемые форматы с двумя АМО-связывающими доменами, неразрезаемые форматы с двумя АМО-связывающими доменами (любой из которых может иметь одинаковые АМО-связывающие домены или разные связывающие домены) и неразрезаемые форматы с одним целевым доменом.

#### Разрезаемые форматы с двойным нацеливанием

[00212] Данное изобретение обеспечивает неизомеризуемые разрезаемые форматы типа «Формата 1» на Фиг. 1. В данном варианте осуществления ограниченный Fv-домен содержит домены VH и VL, которые связаны с применением ограничивающих разрезаемых линкеров, а ограниченный псевдо Fv-домен использует ограничивающие неразрезаемые линкеры. Для простоты обсуждения оба из них упоминаются в данном документе как “ограничивающие”, но, как обсуждалось выше и продемонстрировано на Фиг. 37, Фиг. 38 и Фиг. 39 когда оба линкера ограничивающие, белок имеет лучшую экспрессию.

[00213] Все конструкции в Формате 1 (а также в других Форматах) также имеют разрезаемый линкер (РЛ), который разрезается опухолевой протеазой человека.

[00214] Данное изобретение относится к пролекарственным белкам, содержащим от N- к С-концу (одАСД-АМО1)- линкер доменов -ограниченный Fv-домен- линкер доменов -(одАСД-АМО2)-РЛ-ограниченный псевдо Fv домен- линкер доменов -одАСД-ЧСА.

[00215] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL либо в ограниченном Fv-доме, либо в ограниченном псевдо Fv-доме может быть (от N- к С-концу) либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер- VH.

[00216] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов-аVH-ОРЛ-аVL-линкер доменов-(одАСД-АМО2)-РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH- линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00217] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -аVH-ОРЛ-аVL-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVH-ОРЛ-iVL -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00218] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов-аVL-ОРЛ-аVH-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОРЛ-iVH -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00219] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов-аVL-ОРЛ-аVH-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVH-ОРЛ-iVL -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00220] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция

содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-НРЛ-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления аVН, аVL, іVН и іVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5.

[00221] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления аVН, аVL, іVН, іVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с одной и той же АМО, которой могут быть EGFR, ЕрСАМ, FOLR1 или В7Н3, последовательности для которых изображены на Фиг. 5.

[00222] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления аVН, аVL, іVН, іVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с различными АМО.

[00223] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления аVН, аVL, іVН, іVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EGFR и ЕрСАМ, и одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00224] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления аVН, аVL, іVН, іVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EGFR и FOLR1, а одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00225] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления аVН, аVL, іVН, іVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EGFR и В7Н3, а одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00226] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-аVН-ОРЛ-аVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-іVL-ОНРЛ-іVН-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте

осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EpCAM и FOLR1, а одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00227] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-aVH-ОРЛ-aVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EpCAM и B7H3, и одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00228] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-aVH-ОРЛ-aVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с B7H3 и FOLR1, и одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00229] В некоторых вариантах осуществления пролекарственная конструкция содержит одАСД (АМО1) -линкер доменов-aVH-ОРЛ-aVL-линкер доменов-одАСД (АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД ( $\frac{1}{2}$ ). В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с одной и той же АМО, которым может быть EGFR, FOLR1, B7H3 или EpCAM, последовательности для которых изображены на Фиг. 5, и ОРЛ и РЛ выбираются из линкера, который разрезается MMP9 или меприном, и одАСД ( $\frac{1}{2}$ ) имеет SEQ ID NO: 45.

[00230] В Формате 1 предпочтительным линкером доменов является SEQ ID NO: 74 (который также служит предпочтительным ограниченным неразрезаемым линкером).

[00231] В Формате 1 предпочтительными конструкциями являются Pro140 и Pro140b.

#### Неразрезаемые форматы

[00232] Как продемонстрировано на Фиг. 2, данное изобретение обеспечивает неизомеризирующиеся неразрезаемые форматы. В данном варианте осуществления понятно, что «неразрезаемый» применяется только к связи ограниченного Fv-домена, поскольку в конструкции пролекарства имеется активирующий сайт разрезания. В данном варианте осуществления ограниченный Fv-домен содержит домены VH и VL, которые связаны с применением ограничивающих неразрезаемых линкеров, а ограниченный псевдо Fv-домен использует ограничивающие неразрезаемые линкеры.

[00233] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL либо в ограниченном Fv-доме, либо в ограниченной псевдо Fv-доме может быть



(от N- к С-концу) либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер- VH.

[00234] Данное изобретение относится к пролекарственным белкам, содержащим от N- к С-концу одАСД (АМО1) -линкер доменов-ограниченный Fv-домен-линкер доменов-одАСД (АМО2) -разрезаемый линкер-ограниченный-псевдо Fv-домен-линкер доменов-одАСД-ЧСА,

[00235] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL либо в ограниченном Fv-домене, либо в ограниченной псевдо Fv-домене может быть (от N- к С-концу) либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер- VH.

[00236] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00237] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVH-ОНРЛ-iVL -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00238] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов-aVL-ОНРЛ-aVH-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00239] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов-aVL-ОНРЛ-aVH-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVH-ОНРЛ-iVL -линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00240] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с одной и той же АМО, которой могут быть EGFR, ЕpСAM, FOLR1 или В7Н3, последовательности для которых изображены на Фиг. 5.

[00241] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с различными АМО.

[00242] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов- (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EGFR и ЕpСAM, и одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00243] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EGFR и FOLR1, а одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00244] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг. 5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с EGFR и B7H3, а одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00245] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с ЕpСАМ и FOLR1, и одАСД-АМО и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00246] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг.5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с ЕpСАМ и B7H3, и одАСД-АМО, и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00247] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг. 5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с FOLR1 и B7H3, и одАСД-АМО, и имеют последовательности продемонстрированные на Фиг.5.

[00248] В некоторых вариантах осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО1) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-линкер доменов (одАСД-АМО2) -РЛ-iVL-ОНРЛ-iVH-линкер доменов-одАСД-АСП. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг. 5. В данном варианте осуществления два нацеливающих домена связываются с

одной и той же АМО, которой может быть EGFR, FOLR1, B7H3 или EpCAM, последовательности для которых изображены на Фиг. 5, и ОРЛ и РЛ выбираются из линкера, который разрезается MMP9 или меприном, и одАСД (½) имеет SEQ ID NO: 45.

[00249] В Формате 2 предпочтительным линкером доменов является SEQ ID NO: 74 (который также служит предпочтительным ограниченным неразрезаемым линкером).

[00250] В Формате 2 варианты осуществления, в частности, включают, но не ограничиваются ими, Pro186, Pro225, Pro226, Pro233, Pro311, Pro312, Pro313, Pro495, Pro246, Pro254, Pro255, Pro256, Pro420, Pro421, Pro432, Pro479, Pro480, Pro187, Pro221, Pro222, Pro223, Pro224, Pro393, Pro394, Pro395, Pro396, Pro429, Pro430 и Pro431.

Конструкции направленные на одну АМО

[00251] Как продемонстрировано на Фиг. 4, конструкции "Формата 4" также включены в композиции по данному изобретению, которые аналогичны конструкциям Формата 2, но без второго АМО АСД. В данном варианте осуществления понятно, что «неразрезаемый» применяется только к связыванию ограниченного Fv-домена, поскольку в конструкции пролекарства имеется активирующий сайт разрезания. В данном варианте осуществления ограниченный Fv-домен содержит домены VH и VL, которые связаны с применением ограничивающих неразрезаемых линкеров, а ограниченный псевдо Fv-домен использует ограничивающие неразрезаемые линкеры.

[00252] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL либо в ограниченном Fv-доме, либо в ограниченном псевдо Fv-доме может быть (от N- к С-концу) либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер- VH.

[00253] Данное изобретение относится к пролекарственным белкам, содержащим от N- к С-концу одАСД (АМО) - линкер доменов-ограниченный Fv-домен-разрезаемый линкер-одАСД-ЧСА-ограниченный псевдо Fv домен. (Обратите внимание, что для всех конструкций для этого формата одАСД-ЧСА обычно не имеет тега His6, хотя он может быть включен).

[00254] Как будет понятно специалистам в данной области техники, порядок VH и VL либо в ограниченном Fv-доме, либо в ограниченной псевдо Fv-доме может быть (от N- к С-концу) либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер- VH.

[00255] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-РЛ- (одАСД-ЧСА) -линкер доменов -iVL-ОНРЛ-iVH,

[00256] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-РЛ- (одАСД-ЧСА) -линкер доменов -iVH-ОНРЛ-iVL,

[00257] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО) -линкер доменов -aVL-ОНРЛ-aVH-РЛ- (одАСД-ЧСА) -линкер доменов -iVH-ОНРЛ-iVL,

[00258] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО) -линкер доменов -aVL-ОНРЛ-aVH-РЛ- (одАСД-

ЧСА) -линкер доменов-iVL-ОНРЛ-iVH,

[00259] Таким образом, в одном варианте осуществления пролекарственный белок содержит от N- к С-концу: (одАСД-АМО) -линкер доменов -aVH-ОНРЛ-aVL-РЛ- (одАСД-ЧСА) -линкер доменов -iVL-ОНРЛ-iVH. В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг. 5. В данном варианте осуществления домен нацеливания связывается с АМО, которая может представлять собой EGFR, ЕpСAM, FOLR1 или В7Н3, последовательности для которых изображены на Фиг. 5.

[00260] В Формате 4 предпочтительным доменным линкером является SEQ ID NO: 74 (который также служит предпочтительным ограниченным неразрезаемым линкером).

[00261] В Формате 4 предпочтительным одАСД-ЧСА является SEQ ID NO: 45.

Двухбелковые композиции

[00262] В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат две разные молекулы, иногда называемые «hemi-COBRA™» или «hemi-конструкциями», которые в отсутствие разрезания внутримолекулярно связываются с образованием псевдо Fv. В присутствии протеазы сайты разрезания разрезаются, высвобождая инертные переменные домены, а затем пара белка образует активный антигенсвязывающий домен с CD3, как в целом продемонстрировано на Фиг. 3.

[00263] Что важно в конструкции hemi-конструкций, так это то, что активный переменный домен и одАСД-АМО остаются вместе после разрезания, так что две разрезанные части удерживаются вместе рецептором опухолевого антигена на поверхности опухоли и затем могут образовывать активный анти-CD3-связывающий домен.

[00264] Существуют две разные общие конструкции Формата 3, в которых каждый член пары имеет один одАСД-АМО (Фиг. 3А) и один с двумя различными одАСД-АМО, каждый из которых имеет свою АМО (Фиг. 3В).

1. Hemi-COBRA™ конструкции с единичными АМО-связывающими доменами (Формат 3А)

[00265] В некоторых вариантах осуществления первый hemi-COBRA™ имеет от N- к С-концу одАСД (АМО1) -линкер доменов-aVH-РЛ-iVL-линкер доменов -dАСД (1/2), а второй имеет одАСД (1/2) - линкер доменов-iVH-РЛ-aVL-линкер доменов-одАСД (АМО2). В данном варианте осуществления aVH, aVL, iVH, iVL и одАСД (1/2) имеют последовательности, продемонстрированные на Фиг. 5, и одАСД-АМОа связываются с EGFR человека, ЕpСAM, FOLR1 и/или В7Н3 и имеют изображенную на Фиг. 5 последовательность.

2. Hemi-COBRA™ конструкторы с двойными АМО АСД

[00266] В некоторых вариантах осуществления изобретения парные пролекарственные конструкции могут иметь два связывающих домена одАСД-АМО на конструкцию, как продемонстрировано на Фиг. 3В. В этих вариантах осуществления первый член пары содержит от N- к С-концу одАСД-АМО1-линкер доменов-одАСД-

АМО2-аVH-РЛ-іVL-линкер доменов-одАСД (ЧСА) и второй член содержит от N- к С-концу одАСД-АМО1-линкер доменов -одАСД-АМО2-аVL-РЛ-іVH-линкер доменов-одАСД-ЧСА.

[00267] Два одАСД-АМО для каждого члена пары различны, но обычно оба члена (hemi-COBRA™) имеют одинаковые два одАСД-АМО, например, оба имеют EGFR и FOLR1 или EGFR и B7H3 и т. д.

[00268] Два одАСД-АМО в некоторых вариантах осуществления выбираются из тех, которые продемонстрированы на Фиг. 5.

Способы изготовления композиций по данному изобретению

[00269] Композиции пролекарств по данному изобретению изготавливают, как это обычно будет понятно специалистам в данной области, и это описано в общих чертах ниже.

[00270] Данное изобретение обеспечивает композиции нуклеиновых кислот, которые кодируют пролекарственные композиции по данному изобретению. Как будет понятно специалистам в данной области, композиции нуклеиновых кислот будут зависеть от Формата полипептида(ов) пролекарства. Таким образом, например, когда Формат требует две аминокислотные последовательности, такие как конструкции «Формата 3», две последовательности нуклеиновой кислоты могут быть включены в один или несколько векторов экспрессии для экспрессии. Аналогично, для пролекарственных конструкций, которые представляют собой один полипептид (Форматы 1, 2 и 4), для производства требуется одна нуклеиновая кислота в одном векторе экспрессии.

[00271] Как известно в данной области, нуклеиновые кислоты, кодирующие компоненты по данному изобретению, могут быть включены в векторы экспрессии, как известно в данной области, и в зависимости от клеток-хозяев, используемых для получения пролекарственных композиций по данному изобретению. Как правило, нуклеиновые кислоты функционально связаны с любым количеством регуляторных элементов (промоторы, происхождение репликации, селективируемые маркеры, сайты связывания рибосом, индукторы и т. д.). Векторы экспрессии могут быть внехромосомными или интегрирующими векторами.

[00272] Затем нуклеиновые кислоты и/или векторы экспрессии по данному изобретению трансформируют в любое количество различных типов клеток-хозяев, как хорошо известно в данной области, включая клетки млекопитающих, бактерий, дрожжей, насекомых и/или грибов, и клетки млекопитающих (например, клетки CHO, клетки 293), находят применение во многих вариантах осуществления.

[00273] Композиции пролекарств по данному изобретению получают путем культивирования клеток-хозяев, содержащих вектор (ы) экспрессии, как это хорошо известно в данной области. После получения выполняются традиционные стадии очистки антител, включая стадию аффинной хроматографии с белком А и/или стадию ионообменной хроматографии.

Составление и введение пролекарственных композиций по данному изобретению

[00274] Составы пролекарственных композиций, используемых в соответствии с данным изобретением, готовят для хранения путем смешивания пролекарств (отдельных белков в случае Форматов 1, 2 и 4 и двух белков в случае Формата 3), имеющих желаемый степень чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (как обычно указано в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]), в форме лиофилизированных составов или водных растворов.

[00275] Композиции пролекарств по данному изобретению вводят субъекту в соответствии с известными способами, такими как внутривенное введение в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение какого-либо периода времени.

[00276] Пролекарственные композиции по данному изобретению полезны при лечении рака.

#### Примеры

Пример 1: Получение и очистка про конструкций

#### [00277] Трансфекции

[00278] Каждый белок (например, отдельные белки для Форматов 1, 2 и 4) или пары конструкций (Формат 3) были экспрессированы из отдельного вектора экспрессии (производное pcdna3.4). Равные количества плазмидной ДНК, кодирующей пару hemi-sobga или одноцепочечных конструкций, смешивали и трансфицировали в клетки Expi293 в соответствии с протоколом трансфекции производителя. Кондиционированную среду собирали через 5 дней после трансфекции центрифугированием (6000 об/мин x 25') и фильтрацией (фильтр 0,2 мкм). Экспрессия белка была подтверждена SDS-PAGE. Конструкции очищали, и конечная буферная композиция представляла собой: 25 mM цитрата, 75 mM аргинина, 75 mM NaCl, 4% сахарозы, pH 7. Конечные препараты хранили при -80°C.

#### [00279] Активация MMP9

[00280] Рекомбинантный (рк) MMP9 человека активировали в соответствии со следующим протоколом. Рекомбинантный человеческий MMP-9 (R & D # 911-MP-010) в концентрации 0,44 мг/мл (4,7 мкМ). Ацетат п-аминофенилртути (APMA) (Sigma) готовят в концентрации стока 100 mM в ДМСО. Буфер для анализа представляет собой 50 mM Трис, pH 7,5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 0,05% Brij-35.

[00281] - Развести ркMMP9 буфером для анализа до ~ 100 мкг/мл (25 мкл чMMP9+75 мкл буфера для анализа)

[00282] - Добавить ацетат п-аминофенилртути (APMA) из 100 mM стокового раствора в ДМСО до конечной концентрации 1 mM (от 1 мкл до 100 мкл)

[00283] - Инкубировать при 37°C в течение 24 часов.

[00284] - Развести MMP9 до 10 нг/мкл (добавьте 900 мкл буфера для анализа к 100 мкл активированного раствора)

[00285] Концентрация активированной ркMMP9 составляет ~ 100 нМ.

[00286] Расщепление конструкций для анализов TDCC

[00287] Для разрезания конструкций 100 мкл образца белка в концентрации 1 мг/мл (10,5 мкМ) в буфере для приготовления препарата (25 мМ лимонная кислота, 75 мМ L-аргинин, 75 мМ NaCl, 4% сахароза) снабжали CaCl<sub>2</sub> до 10 мМ. Активированный ркММР9 добавляли до концентрации 20-35 нМ. Образец инкубировали при комнатной температуре в течение ночи (16-20 часов). Полноту разрезания подтверждали с применением SDS PAGE (10-20% TG, рабочий буфер TG, 200 В, 1 час). Образцы обычно расщеплялись на 98%.

Пример 2: Анализы на Т-клеточно зависимую цитотоксичность (TDCC)

[00288] Клетки HT-29, трансформированные люциферазой светлячка, выращивали до приблизительно 80% слияния и отделяли с помощью Versene (0,48 мМ ЭДТА в PBS-Ca-Mg). Клетки центрифугировали и ресуспендировали в среде TDCC (5% инактивированной нагреванием FBS в RPMI 1640 с HEPES, GlutaMax, пируватом натрия, несущественными аминокислотами и β-меркаптоэтанолом). Очищенную общую популяцию Т клеток человека оттаивали, центрифугировали и ресуспендировали в среде TDCC.

[00289] Совместную культуру клеток HT-29\_Luc и Т-клеток добавляли в 384-луночные планшеты для культивирования клеток. Затем к кокультуре добавляли серийно разведенные COBRA и инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Наконец, в планшеты добавляли равный объем реагента для анализа люциферазы SteadyGlo и инкубировали в течение 20 минут. Планшеты считывали на Perkin Elmer Envision со временем экспозиции 0,1 с/лунку. Общая люминисценция была зарегистрирована, и данные были проанализированы на GraphPad Prism 7.

Пример 3: Разработка общего протокола модели эффективности переноса Т-клеток *In Vivo*

[00290] Данные протоколы использовались во многих экспериментах представленных на фигурах. Опухолевые клетки имплантировали подкожно (ПК) в правый бок мышей NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (*The Jackson Laboratory*, Cat. No. 005557) и давали возможность расти до достижения развитой опухоли со средним объемом около 200 мм<sup>3</sup>. Параллельно человеческие Т-клетки культивировали в среде для Т-клеток (X-VIVO 15 [Lonza, кат. № 04-418Q], 5% сыворотки человека, 1% пенициллин/стрептомицин, 0,01 мМ 2-меркаптоэтанол) в G-Rex100M газопроницаемой колбе (Wilson Wolf, кат. № 81100S) с MACSiBeads из набора активации/размножения Т-клеток (Miltenyi, кат. № 130-091-441) в течение примерно 10 дней и с добавлением рекомбинантного белка IL-2 человека. Рост опухоли у мышей и активация/размножение Т-клеток человека были скоординированы таким образом, что в день 0 исследуемых мышей рандомизировали в группы (N=6) на основании размера опухоли; затем каждому вводили внутривенно (в/в)  $2,5 \times 10^6$  культивируемых человеческих Т-клеток и вводили первую дозу COBRA или контрольных молекул. Мышам вводили дозу каждые 3 дня по 7 доз (дни 0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18), а затем следили еще 2-3 недели, пока опухоли не достигли > 2000 мм<sup>3</sup> в объеме или исследование не было прекращено. Объем опухолей измеряли

каждые 3 дня.

Пример 4: *In Vivo* Активность с парой EGFR/MMP9 Hemi-COBRA Pro77 и Pro53.

[00291]  $5 \times 10^6$  клеток LoVo или  $5 \times 10^6$  клеток HT29 имплантировали подкожно в правый бок мышей NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (*The Jackson Laboratory*, Cat. No. 005557) и позволили расти, пока опухоли не были установлены. Параллельно человеческие Т-клетки культивировали в среде Т-клеток (X-VIVO 15 [Lonza, кат. № 04-418Q], 5% сыворотки человека, 1% пенициллин/стрептомицин, 0,01 мМ 2-меркаптоэтанол) в G-Rex100М газопроницаемой колбе (Wilson Wolf, кат. № 81100S) с MACSiBeads из набора активации/размножения Т-клеток (Miltenyi, кат. № 130-091-441) в течение 10 дней и дополненная рекомбинантным белком IL-2 человека. Рост опухоли у мышей и активация/размножение Т-клеток человека были скоординированы таким образом, что в день 0 исследуемых мышей рандомизировали в группы (N=6) на основании размера опухоли; затем каждой вводили внутривенно (в/в)  $2,5 \times 10^6$  культивируемых человеческих Т-клеток и вводили первую дозу COBRA или контрольных молекул. Мышам вводили дозу каждые 3 дня по 7 доз (дни 0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18), а затем следили до тех пор, пока объем опухолей не достигнет  $> 2000 \text{ мм}^3$  или исследование не было прекращено. Группы получали 0,2 мг/кг (мнк) анти-EGFR x CD3-положительного контроля Pro51-биспецифичного антитела (bsAb), 0,5 мг/кг анти-лизоцима куриного яйца (HEL) x CD3 bsAb Pro98, 0,5 мнк каждого из, содержащих MMP9 разрезаемый линкер, пары Pro77 и Pro53 анти-EGFR hemi-COBRA, или 0,5 мкл каждого из, содержащего неразрезаемый линкер (НРЛ), пары Pro74 и Pro72 анти-EGFR hemi-COBRA. Объем опухолей измеряли каждые 3 дня.

Пример 5: *In Vivo* Активность с EGFR/MMP9 COBRA Pro140.

[00292]  $5 \times 10^6$  клеток LoVo или  $5 \times 10^6$  клеток HT29 имплантировали подкожно в правый бок мышей NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (*The Jackson Laboratory*, Cat. No. 005557) и позволили расти, пока опухоли не были развиты. Параллельно человеческие Т-клетки культивировали в Т-клеточных средах (X-VIVO 15 [Lonza, Кат. № 04-418Q], 5% человеческой сыворотки, 1% пенициллин/стрептомицин, 0,01 мМ 2-меркаптоэтанол) в G-Rex100М газопроницаемой колбе (Wilson Wolf, кат. № 81100S) с MACSiBeads из набора активации/размножения Т-клеток (Miltenyi, кат. № 130-091-441) в течение 10 дней и добавлением рекомбинантного белка IL-2 человека. Рост опухоли у мышей и активация/размножение Т-клеток человека были скоординированы таким образом, что в день 0 исследуемых мышей рандомизировали в группы (N=6) на основании размера опухоли; затем каждой вводили внутривенно (в/в)  $2,5 \times 10^6$  культивируемых человеческих Т-клеток и вводили первую дозу COBRA или контрольных молекул. Мышам вводили дозу каждые 3 дня по 7 доз (дни 0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18), а затем наблюдали до тех пор, пока объем опухолей не достигнет  $>2000 \text{ мм}^3$  или пока исследование не было прекращено. Группы получали 0,2 мнк биспецифичного антитела (bsAb) Pro51 против EGFR x CD3, 0,5 мнк анти-лизоцима куриного яйца (HEL) x CD3 bsAb Pro98 или 0,5 мнк, содержащего разрезаемый линкер, MMP9, EGFR COBRA Pro140. Объем опухолей измеряли каждые 3



дня.

Пример 6: *In Vivo* Активность с EGFR/MMP9 COBRA Pro186.

[00293]  $5 \times 10^6$  клеток HT29 имплантировали подкожно в правый бок мышей NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) (*The Jackson Laboratory*, Cat. No. 005557) и позволяли расти до образования опухолей. Параллельно человеческие Т-клетки культивируют в Т-клеточной среде (X-VIVO 15 [*Lonza*, Кат. № 04-418Q], 5% человеческой сыворотки, 1% пенициллин/стрептомицин, 0,01 мМ 2-меркаптоэтанол) в G-Rex100M газопроницаемой колбе (*Wilson Wolf*, кат. № 81100S) с MACSiBeads из набора активации/размножения Т-клеток (*Miltenyi*, кат. № 130-091-441) в течение 10 дней и добавляли рекомбинантный белок IL-2 человека. Рост опухоли у мышей и активация/размножение Т-клеток человека были скоординированы таким образом, что в день 0 исследуемых мышей рандомизировали в группы (N=6) на основании размера опухоли; затем каждому вводили внутривенно (в/в)  $2,5 \times 10^6$  культивируемых человеческих Т-клеток и вводили первую дозу COBRA или контрольных молекул. Мышам вводили дозу каждые 3 дня по 7 доз (дни 0, 3, 6, 9, 12, 15 и 18), а затем следили до тех пор, пока объем опухолей не достигнет  $>2000$  мм<sup>3</sup> или исследование не было прекращено. Группы получали 0,1 мг/кг (мнк) биспецифичного антитела (bsAb) положительного контроля анти-EGFR x CD3 Pro51, 0,3 мнк, содержащего неразрезаемый линкер (НПЛ), контрольного анти-EGFR COBRA Pro214, 0,1 или 0,3 мнк, содержащего разрезаемый MMP9 линкер, анти-EGFR COBRA Pro140, или 0,1 или 0,3 мнк, содержащего разрезаемый MMP9 линкер, анти-EGFR COBRA Pro186. Объем опухолей измеряли каждые 3 дня.

Пример: Успешная гуманизация последовательностей против EGFR

[00294] Результаты продемонстрированы ниже.

Молекула	КД (М)	Kon (1/Мс)	Kdis (1/с)
Pro22 (родительский EGFR)	2,58E-09M/2,6 нМ	2,05E+05	5,27E-04
Pro90 (hEGFR1)	2,00E-09M/2,0 нМ	2,21E+05	4,40E-04
Pro48 (EGFR2)	2,89E-09M/2,9 нМ	6,09E+05	1,76E-03
Pro137 (hEGFR2)	4,36E-09M/4,4 нМ	5,85E+05	2,55E-03
Pro51 (hEGFR2)	3,27E-09M/3,2 нМ	6,45E+05	2,11E-03
Pro201 (hEGFR2 с 2 сайтами связывания)	2,25E-12M/2,3 пМ	1,55E+06	3,48E-06

[00295] Данные результаты демонстрируют, что гуманизация доменов, связывающих EGFR, была успешной, и что существует сильная авидность к EGFR-мишени, когда две сайта связывания находятся на молекуле.

[00296] Пример: Успешная гуманизация EpCAM одАСД

[00297] Результаты продемонстрированы ниже.

Клон	Аффинность связывания молекулы человека (нМ)	Аффинность связывания молекулы яванского макака (нМ)	перекрестная реактивность яванский макак/человек
VIB-13	2,3	11,6	5
hVIB-13	2,8	12,7	4,5
VIB-23	4,2	46,7	11,1
hVIB-23	4,1	58,8	12,6

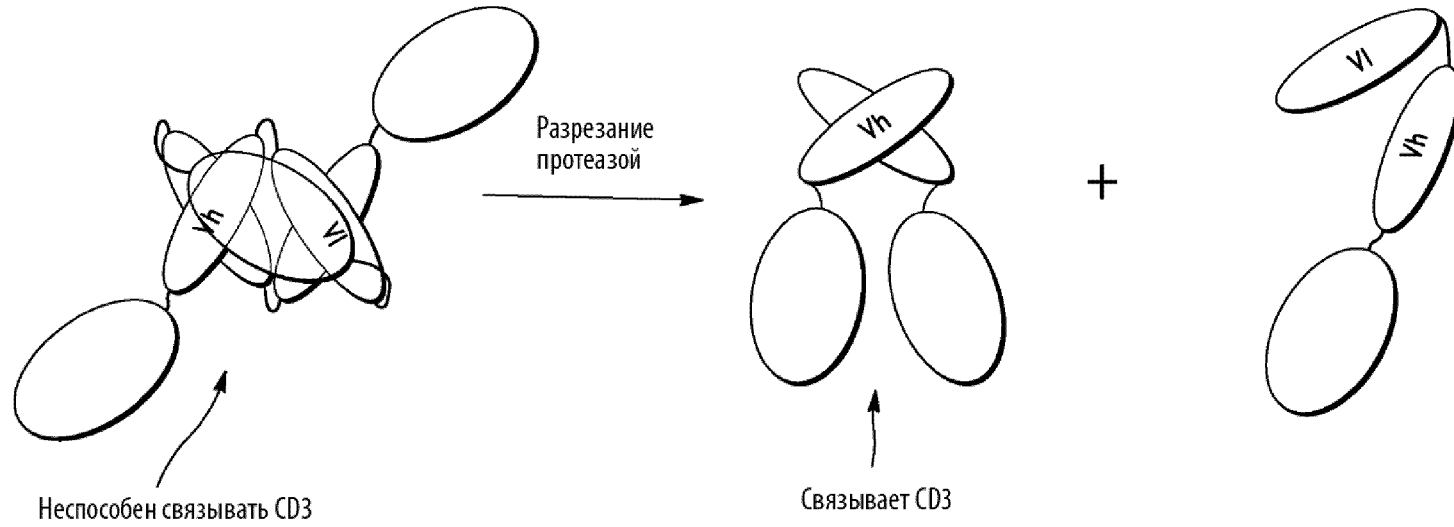
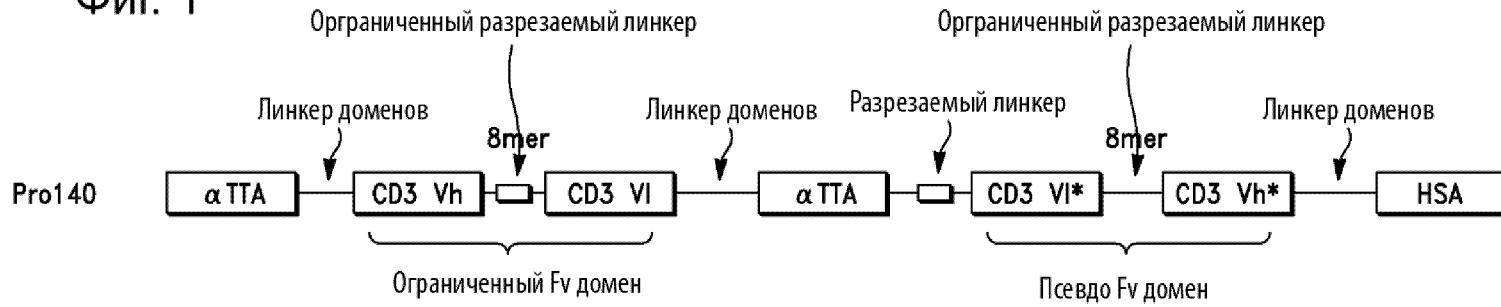
Данные результаты демонстрируют, что гуманизация доменов связывания ЕрСAM была успешной.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

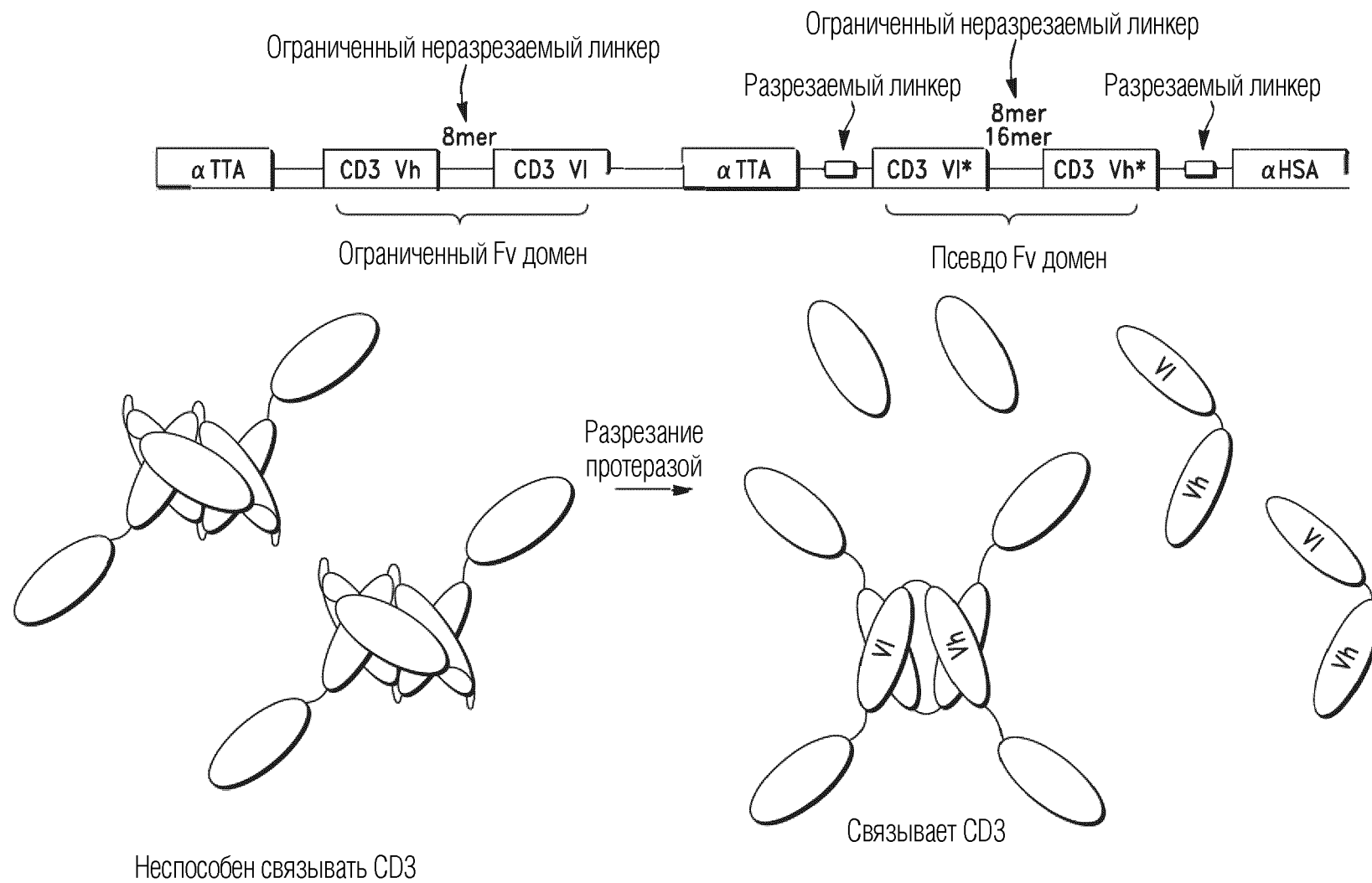
1. Белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:147.
2. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок по п. 1.
3. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 2.
4. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 3.
5. Способ получения белка, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 4 в условиях, при которых указанный белок экспрессируется, и выделение указанного белка.
6. Применение белка по п. 1, отличающееся тем, что оно направлено на получение лекарственного средства для лечения рака.

По доверенности

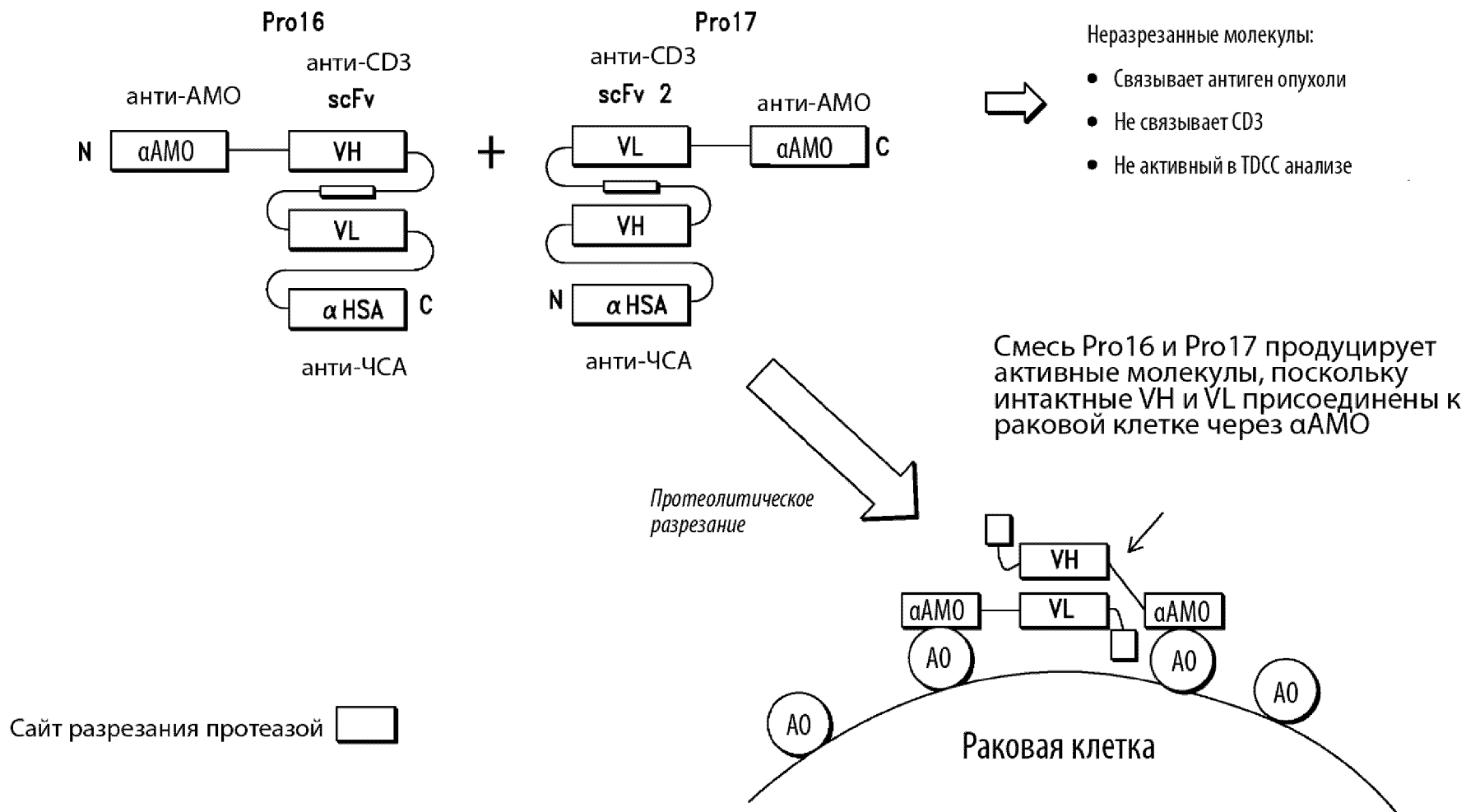
Фиг. 1



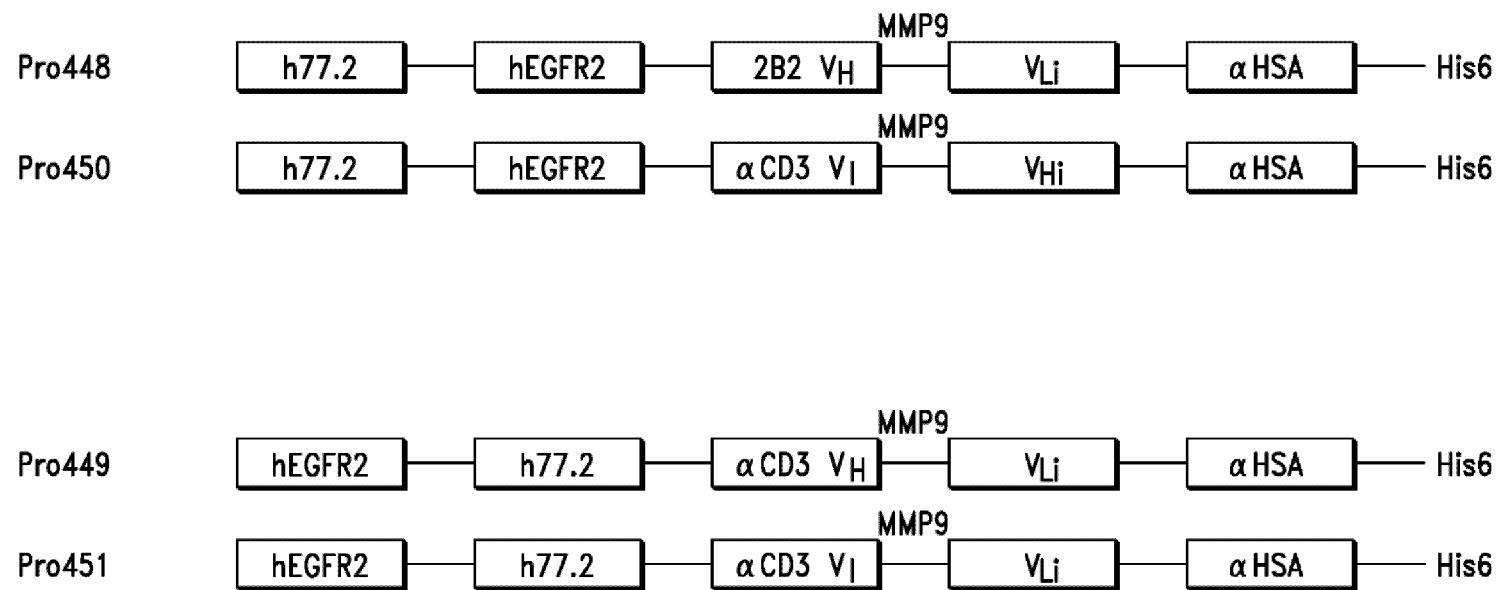
ФИГ. 2



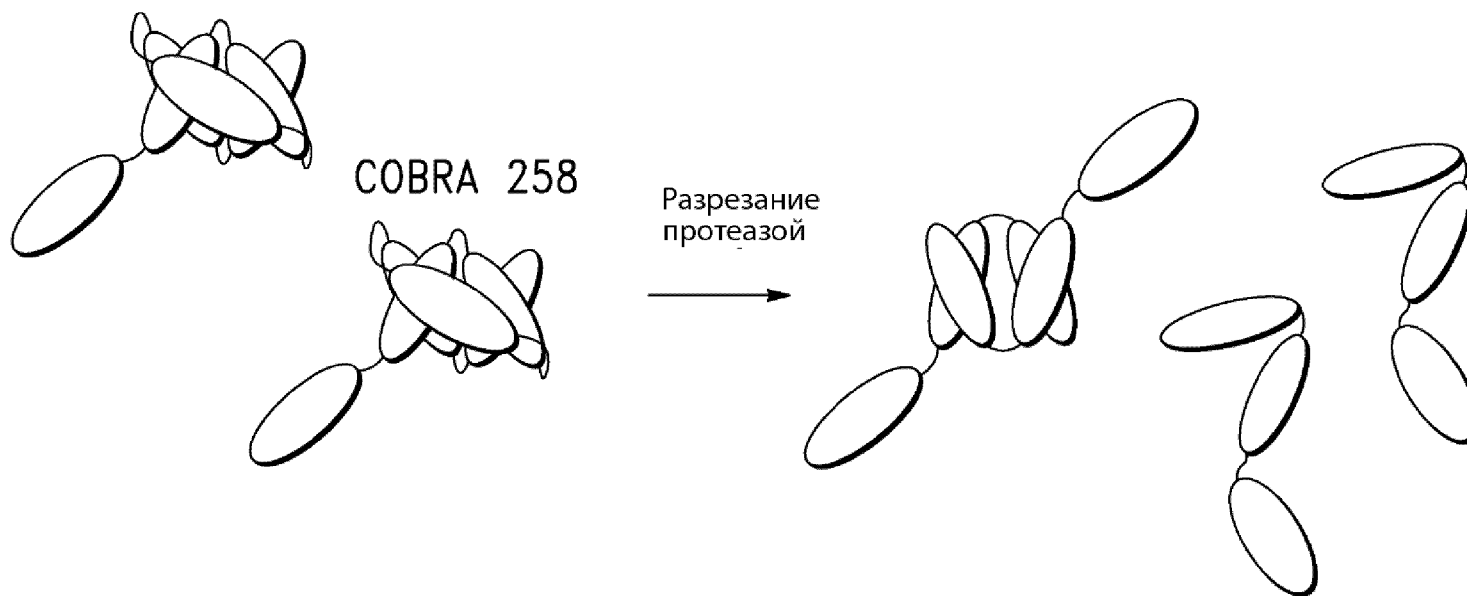
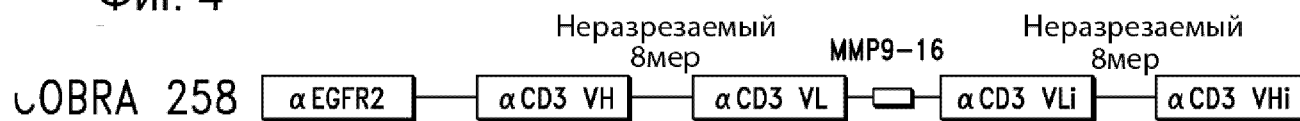
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4





## Фиг. 5А

Нацеливающие одАг $\alpha$ EGFR1

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS**GRTFSSYAMG**WFRQAPGKEREFVVA**INWSSGSTYYADS**  
**VKGR**RFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA**GYQINSGNYNFKDYEYDY**WGQGTQVTVS  
S (SEQ ID NO:1)

sdCDR1 **GRTFSSYAMG** (SEQ ID NO:2)

sdCDR2 **INWSSGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:3)

sdCDR3 **GYQINSGNYNFKDYEYDY** (SEQ ID NO:4)

 $\alpha$ EGFR2

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVSG**GISWRGDSTGYAD**  
**SVKGR**RFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:5)

sdCDR1 **GRTSRSYGMG** (SEQ ID NO:6)

sdCDR2 **GISWRGDSTGYADSVKG** (SEQ ID NO:7)

sdCDR3 **AAGSAWYGTLYEYDY** (SEQ ID NO:8)

h $\alpha$ EGFR1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GRTFSSYAMG**WFRQAPGKEREFVVA**INWSSGSTYYADS**  
**VKGR**RFTISRDNASKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA**GYQINSGNYNFKDYEYDY**WGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:9)

sdCDR1 **GRTFSSYAMG** (SEQ ID NO:10)

sdCDR2 **INWSSGSTYYADSVKG** (SEQ ID NO:11)

sdCDR3 **GYQINSGNYNFKDYEYDY** (SEQ ID NO:12)

h $\alpha$ EGFR2

QVKLVESGGGWVRPGGSLTLSCAAS**GRTSRSYGMG**WFRQAPGKEREFVSG**GISWRGDSTGYAD**  
**SVKGR**RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAA**AAGSAWYGTLYEYDY**WGQGTQVTVSS  
(SEQ ID NO:13)

sdCDR1 **GRTSRSYGMG** (SEQ ID NO:14)

sdCDR2 **GISWRGDSTGYADSVKG** (SEQ ID NO:15)

sdCDR3 **AAGSAWYGTLYEYDY** (SEQ ID NO:16)

## Фиг. 5В

Нацеливающие одАт - продолжениеαFOLR1 h77-2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTVSNSVMA**WYRQTPGNREFVA**IINSIGITNYADSVK**  
**GRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNR**NFDRIY**WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:17)

sdCDR1 **GFTVSNSVMA** (SEQ ID NO:18)

sdCDR2 **IINSIGITNYADSVKG** (SEQ ID NO:19)

sdCDR3 **NFDRIY** (SEQ ID NO:20)

αFOLR1 h59.3

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAP**GNTFSISAMG**WYRQAPGKQREWWA**VTHSDYSTNYADS**  
**VKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKH**YGIDY**WGQGTLTVSS (SEQ ID NO:21)

sdCDR1 **GNTFSISAMG** (SEQ ID NO:22)

sdCDR2 **VTHSDYSTNYADSVKG** (SEQ ID NO:23)

sdCDR3 **YGIDY** (SEQ ID NO:24)

αFOLR1 h22-4

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEAS**GTTFSRDVMG**WYRQAPGKQRELVA**IISRGGSTNYADSV**  
**KGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNAN**NTATWGRV**WGQGTLTVSS (SEQ ID  
 NO:25)

sdCDR1 **GTTFSRDVMG** (SEQ ID NO:26)

sdCDR2 **IISRGGSTNYADSVKG** (SEQ ID NO:27)

sdCDR3 **NTATWGRV** (SEQ ID NO:28)

αB7H3 hF7

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPS**RRTFHTYHMG**WFRQAPGKEREFVA**VINWSGGSTVYAD**  
**SVKGRFTISRDN**SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**AGATTQRATEASYDY**WGQGTLTVSS  
 (SEQ ID NO:29)

sdCDR1 **RRTFHTYHMG** (SEQ ID NO:30)

sdCDR2 **VINWSGGSTVYADSVKG** (SEQ ID NO:31)

sdCDR3 **GGATTQRATEASYDY** (SEQ ID NO:32)

## Фиг. 5С

Нацеливающие одАт - продолжение $\alpha$ B7H3 hF12

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTSYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGGVLAHHNYEYDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33)

sdCDR1 PRTFSTYSMA (SEQ ID NO:34)

sdCDR2 AINWSGGNTSYADSVKGR (SEQ ID NO:35)

sdCDR3 GGVLAHHNYEYDY (SEQ ID NO:36)

 $\alpha$ EpCAM h13

QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGTGSIFSINLMGWYRQAPGKQRELVARRITSGDSTVYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNLLRSSPGATTPYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)

sdCDR1 GTGSIFSINLMG (SEQ ID NO:38)

sdCDR2 RITSGDSTVYADSVKGR (SEQ ID NO:39)

sdCDR3 LLRSSPGATTPY (SEQ ID NO:40)

 $\alpha$ EpCAM h23

QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCVISGSFSALWAMRWYRQAPGQQRELVASSRGGTTSYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNAIDGHLAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:41)

sdCDR1 GSFSALWAMR (SEQ ID NO:42)

sdCDR2 SSRGGTTSYADSVKGR (SEQ ID NO:43)

sdCDR3 IDGHLAY (SEQ ID NO:44)

 $\alpha$ ЧСА домен увеличения времени полураспада

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWYRQAPGKGLEWVSSSISGSGRDTLYAESVKGRRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:45)

sdCDR1 GFTFSKFGMS (SEQ ID NO:46)

sdCDR2 SISGSGRDTLYAESVKGR (SEQ ID NO:47)

sdCDR3 GGSLSV (SEQ ID NO:48)

EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWYRQAPGKGLEWVSSSISGSGRDTLYAESVKGRRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:142)

## Фиг. 5D

 $\alpha$ CD3 scFv домены $\alpha$ CD3 V<sub>L</sub>

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**ASSTGAVTSGNYPN**WWQQKPGQAPRGLIG**GTKFLVP**GTPARF  
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**TLWYSNRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:49)

aVLCDR1 **ASSTGAVTSGNYPN** (SEQ ID NO:50)

aVLsdCDR2 **GTKFLVP** (SEQ ID NO:51)

aVLsdCDR3 **TLWYSNRWV** (SEQ ID NO:52)

 $\alpha$ CD3 V<sub>L1</sub>

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WWQQKPGQAPRGLIG**DYKDDDDK**GTPA  
RFGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:53)

iVLCDR1 **GSSTGAVTSGNYPN** (SEQ ID NO:54)

iVLsdCDR2 **DYKDDDDK** (SEQ ID NO:55)

iVLsdCDR3 **VLWYSNRWV** (SEQ ID NO:56)

 $\alpha$ CD3 V<sub>L12</sub>

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC**GSSTGAVTSGNYPN**WWQQKPGQAPRGLIG**GTKDDAP**GTPAR  
FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC**VLWYSNRWV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO:57)

iVLCDR1 **GSSTGAVTSGNYPN** (SEQ ID NO:58)

iVLsdCDR2 **GTKDDAP** (SEQ ID NO:59)

iVLsdCDR3 **VLWYSNRWV** (SEQ ID NO:60)

 $\alpha$ CD3 V<sub>H</sub>

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS**GFTFNKYAIN**WWRQAPGKGLEWVA**RIRSKYNNYATYYA**  
**DQVKD**RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR**HANFGNSYISYWAY**WGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO:61)

aVHCDR1 **GFTFNKYAIN** (SEQ ID NO:62)

aVHsdCDR2 **RIRSKYNNYATYYADQVKD** (SEQ ID NO:63)

aVHsdCDR3 **HANFGNSYISYWAY** (SEQ ID NO:64)

## Фиг. 5E

 $\alpha$ CD3 scFv домены-продолжение $\alpha$ CD3 V<sub>Hi</sub>

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDD  
KADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVSS  
(SEQ ID NO:65)

iVHsdCDR1 GFTFNKYAMN (SEQ ID NO:66)

iVHsdCDR2 RIRSKYDYKDDDDKADSVKD (SEQ ID NO:67)

iVHsdCDR3 HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:68)

 $\alpha$ CD3 V<sub>Hi2</sub>

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKHAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATAY  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVSS  
(SEQ ID NO:69)

iVHsdCDR1 GFTFNKHAMN (SEQ ID NO:70)

iVHsdCDR2 RIRSKYNNYATAYADSVKD (SEQ ID NO:71)

iVHsdCDR3 HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:72)

 $\alpha$ CD3 scFv линкерыНормальный/Неразрезаемый

GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:73)

Ограничивающий

GGGSGGGGS (SEQ ID NO:74)

## Фиг. 5F

Разрезаемые линкеры (Сайт узнавания жирным шрифтом, сайт разрезания -/)

MMP 2/9

**GPAG/MKGL** (SEQ ID NO:75)

SGG**GPAG/MKGL**PGS (SEQ ID NO:76)

SGGG**GPAG/MKGL**PGGS (SEQ ID NO:77)

Меприн A/B

GGGG**KKLA/DEPE**GGGS (SEQ ID NO:78)

**KKLA/DEPE** (SEQ ID NO:79)

Меприн A/B (высокоэффективный вариант)

GGG**KFLA/DEPE**GG (SEQ ID NO:80)

Катепсин S, K, L

SGGG**ARLQ/SAAP**GGGS (SEQ ID NO:81)

**ARLQ/SAAP** (SEQ ID NO:82)

Меприн/Гранзим B

SGGG**GVYADSLEDG**GGGS (SEQ ID NO:83)

**GVYADSLEDG** (SEQ ID NO:84)

Матриптаза/uPA (MC)

GGGS**LSGR/SDNH**GGGS (SEQ ID NO:85)

**LSGR/SDNHG** (SEQ ID NO:86)

Матриптаза (MB)

SGGG**SFTR/QARVV**GGGS (SEQ ID NO:87)

**SFTR/QARVV** (SEQ ID NO:88)

Катепсины/MMP9/Меприн A

**ARLQ/SAAPAG/LKGA** (SEQ ID NO:89)

MMP9 (высокоэффективный вариант)

GG**GPAG/MHGL**PG (SEQ ID NO:90)

MMP9 (низкоэффективный вариант)

GG**GPAG/MEGL**PG (SEQ ID NO:91)

Фиг. 5G

Разрезаемые линкеры (Сайт узнавания жирным шрифтом, сайт разрезания -/)-продолжение

Тромбин 1 .

**GGGGLVPR/GSLGGGGS** (SEQ ID NO:92)

Тромбин 2 ;

**SSGGGMPR/SFRGGGS** (SEQ ID NO:93)

Энтерокиназа/Flag

**GGGGDYKDDDDK/GGGS** (SEQ ID NO:94)

**KLK7-6**

**SGGGQNPY/SAGRGGGS** (SEQ ID NO:95)

**KLK7-13**

**SGGGQNPY/SAGGGSSG** (SEQ ID NO:96)

**KLK7-11**

**SGGGRNVY/SAGGGSSG** (SEQ ID NO:97)

**KLK7-10**

**SGGGQNTW/SAGKGGGS** (SEQ ID NO:98)

**uPA**

**GGGSHTGR/SAYFGGGS** (SEQ ID NO:99)

**MMP9-2**

**SGGPGPAG/LKGAPGS** (SEQ ID NO:184)

Фиг. 6А

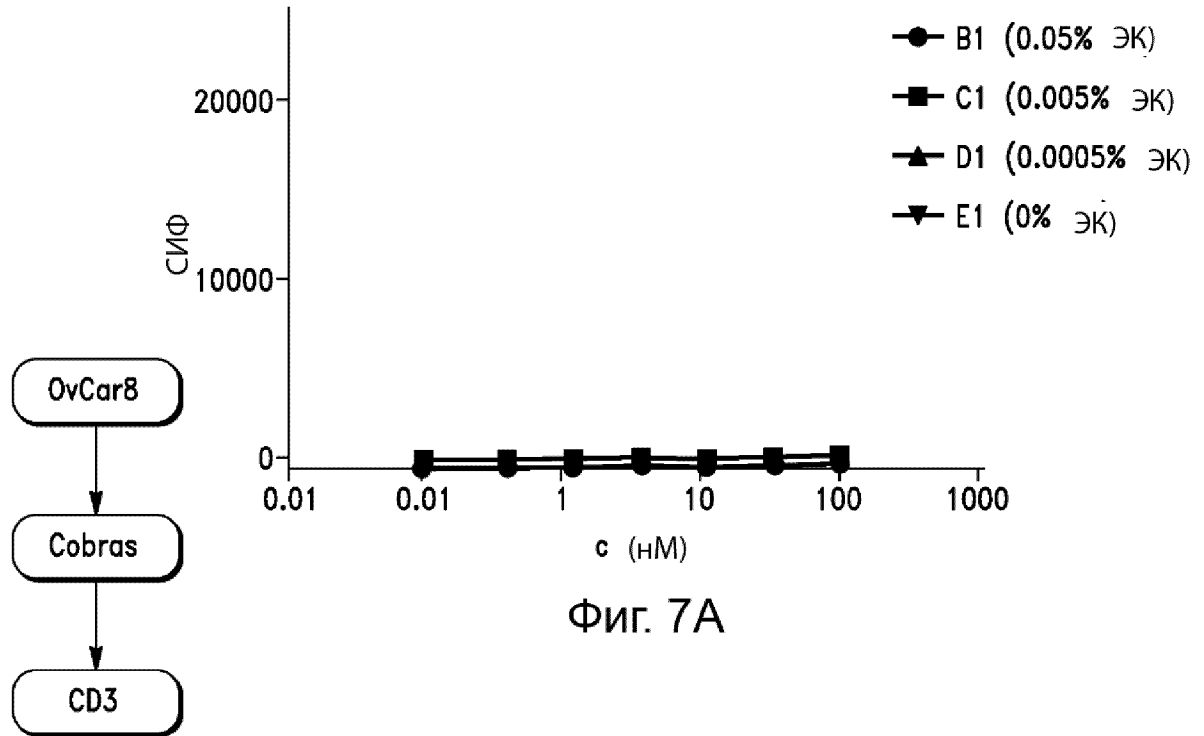
Протеаза	Последовательность домена разрезания	Seq id no:
MMP7	KRALGLPG	100
MMP7	(DE) <sub>8</sub> RPLALWRS(DR) <sub>8</sub>	101
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	102
MMP9	LEATA	103
MMP11	GGAANLVRGG	104
MMP14	SGRIGFLRTA	105
MMP	PLGLAG	106
MMP	PLGLAX	107
MMP	PLGC(ME)AG	108
MMP	ESPAYYTA	109
MMP	RLQLKL	110
MMP	RLQLKAC	111
MMP2, MMP9, MMP14	EP(CIT)G(HOF)YL	112
Урокиназный активатор плазминогена (уап)	SGRSA	113
Урокиназный активатор плазминогена (уап)	DAFK	114
Урокиназный активатор плазминогена (уап)	GGRR	115
Лизосомальный фермент	GFLG	116
Лизосомальный фермент	ALAL	117
Лизосомальный фермент	FK	118
Катепсин В	NLL	119
Катепсин D	PIC(ET)FF	120
Катепсин К	GGPRGLPG	121
Простатспецифический антиген	HSSKLQ	122
Простатспецифический антиген	HSSKLQL	123
Простатспецифический антиген	HSSKLQEDA	124
Протеаза вируса простого герпеса	LVLASSSFGY	125
Протеаза ВИЧ	GVSQNYPIVG	126
Протеаза ЦМВ	GVVQASCRLA	127



Фиг. 6В

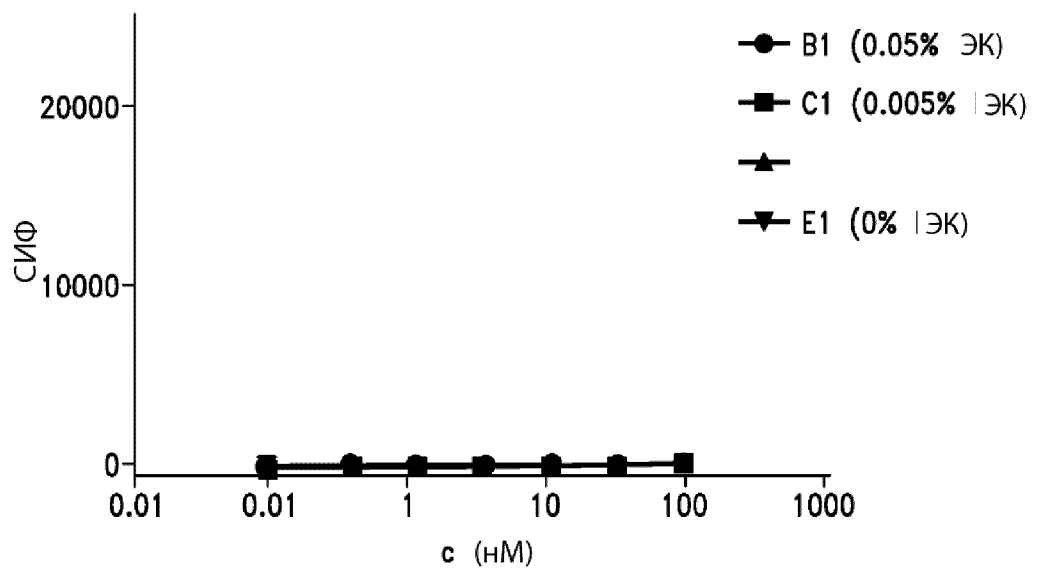
<b>Протеаза</b>	Последовательность домена разрезания	<b>Seq id no:</b>
Тромбин	F(PIP)RS	128
Тромбин	DPRSFL	129
Тромбин	PPRSFL	130
Каспаза-3	DEVDP	131
Каспаза-3	DEVDP	132
Каспаза-3	KGSGDVEG	133
Интенрлейкин 1 $\beta$ конвертирующий фермент	GWEHDG	134
Энтерокиназа	EDDDDKA	135
Гар	KQEQNPGST	136
Калликреин 2	GKAFRR	137
Плазмин	DAFK	138
Плазмин	DVLK	139
Плазмин	DAFK	140
Тор	ALLLALL	141

Связывание разрезанного ЭК Pro6 с OVCAR-8  
Обнаруженное с помощью A488-суCD3::Flag::hFC



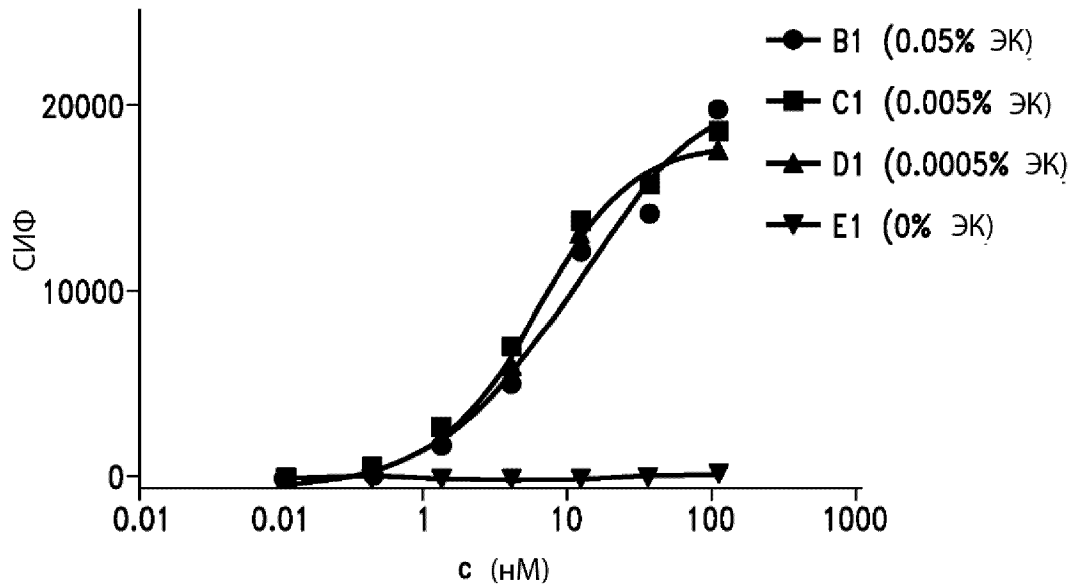
Фиг. 7А

Связывание разрезанного ЭК Pro7 с OVCAR-8  
Обнаруженное с помощью A488-суCD3::Flag::hFC

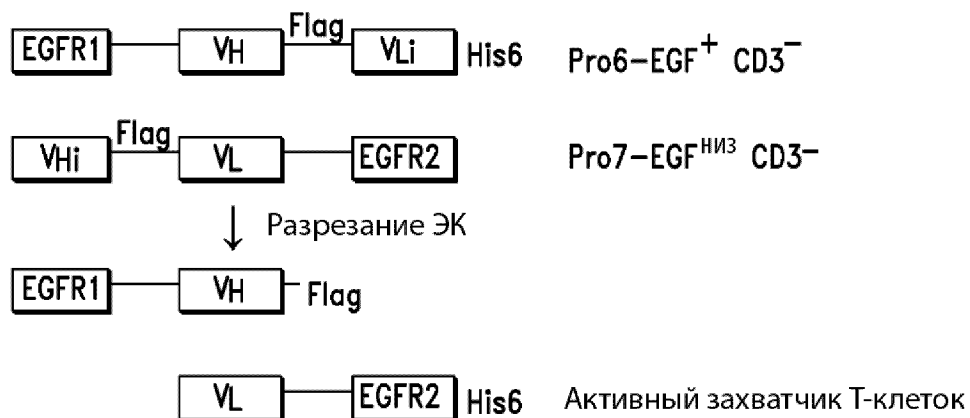


Фиг. 7В

Связывание разрезанного ЭК Pro6+7 с OVCAR-8  
Обнаруженное с помощью A488-суCD3::Flag::huFC

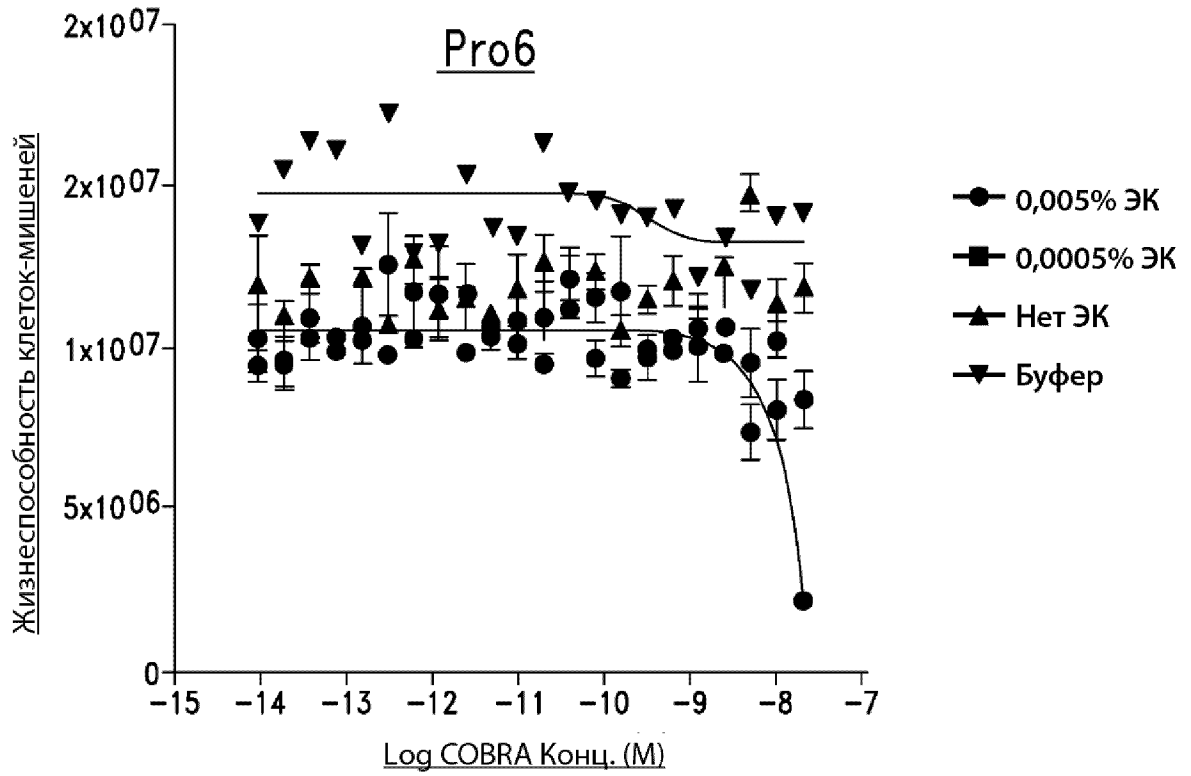


Фиг. 7С

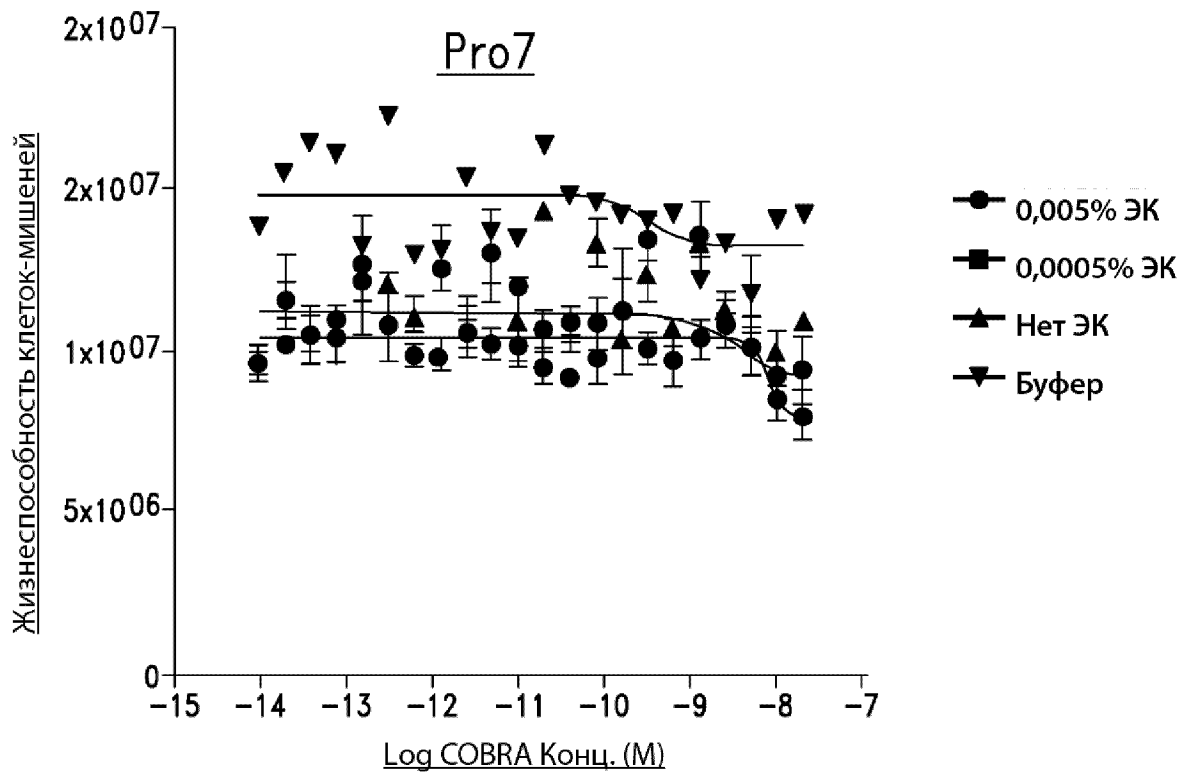


Фиг. 7D

17/105

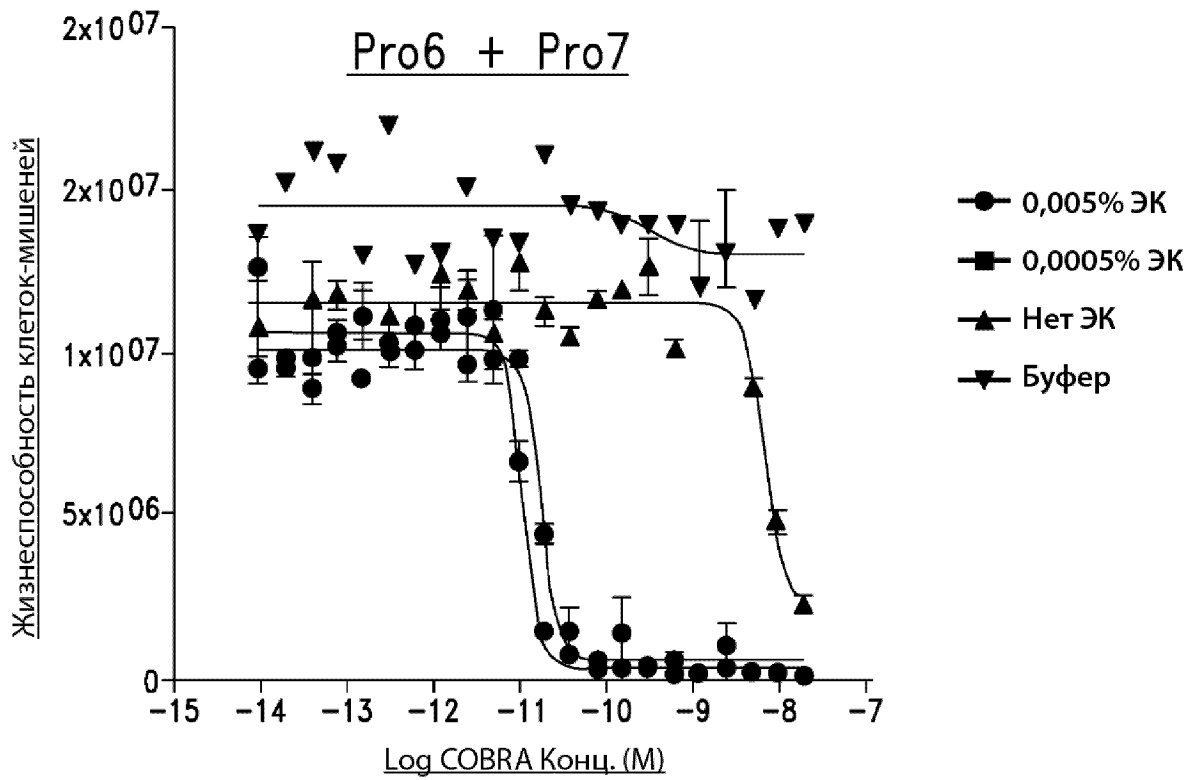


Фиг. 8А

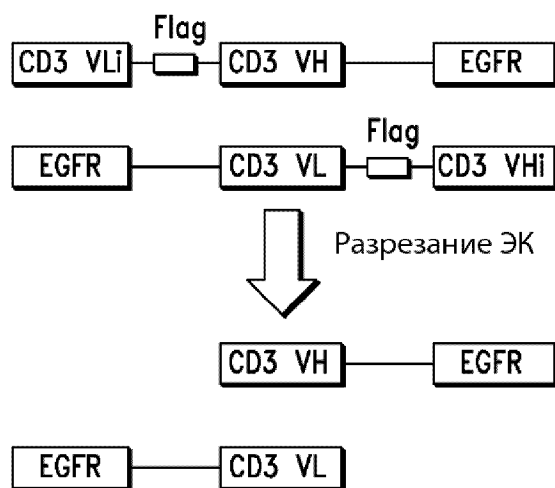


Фиг. 8В

18/105

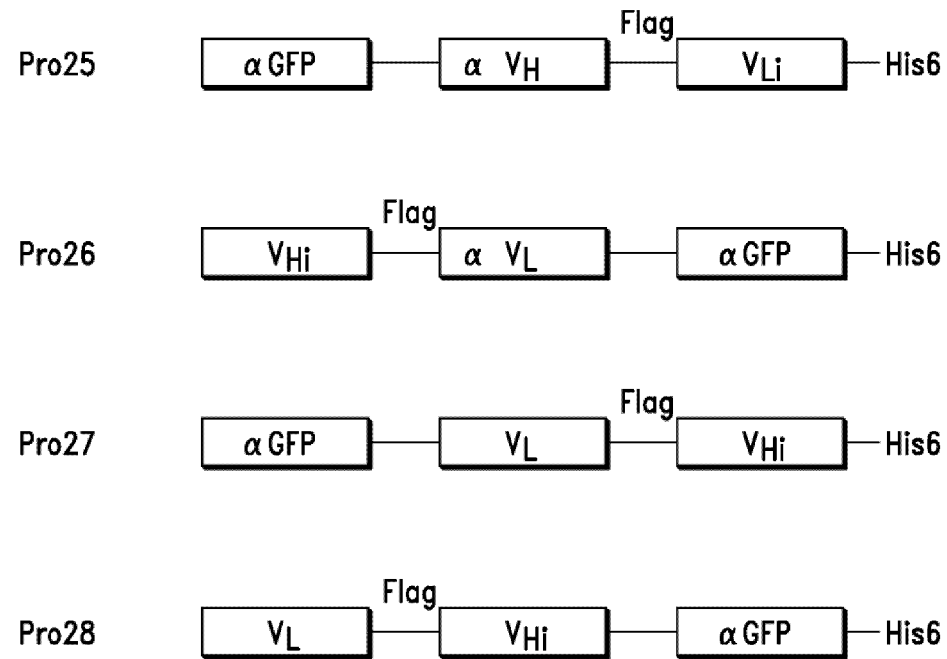


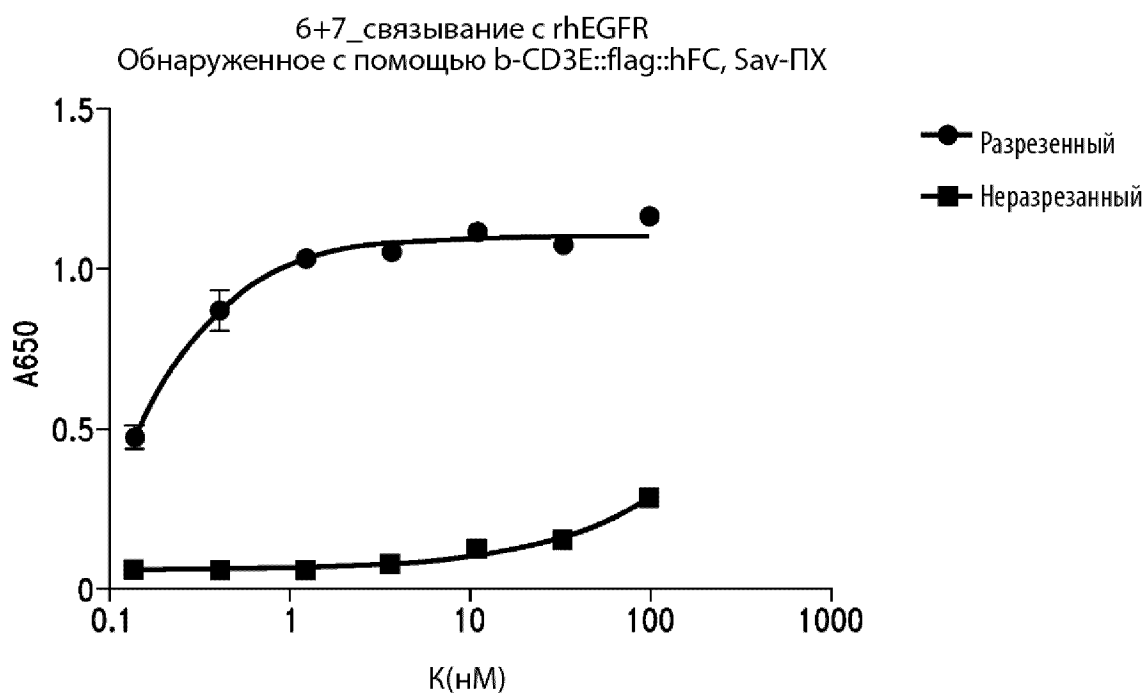
Фиг. 8С



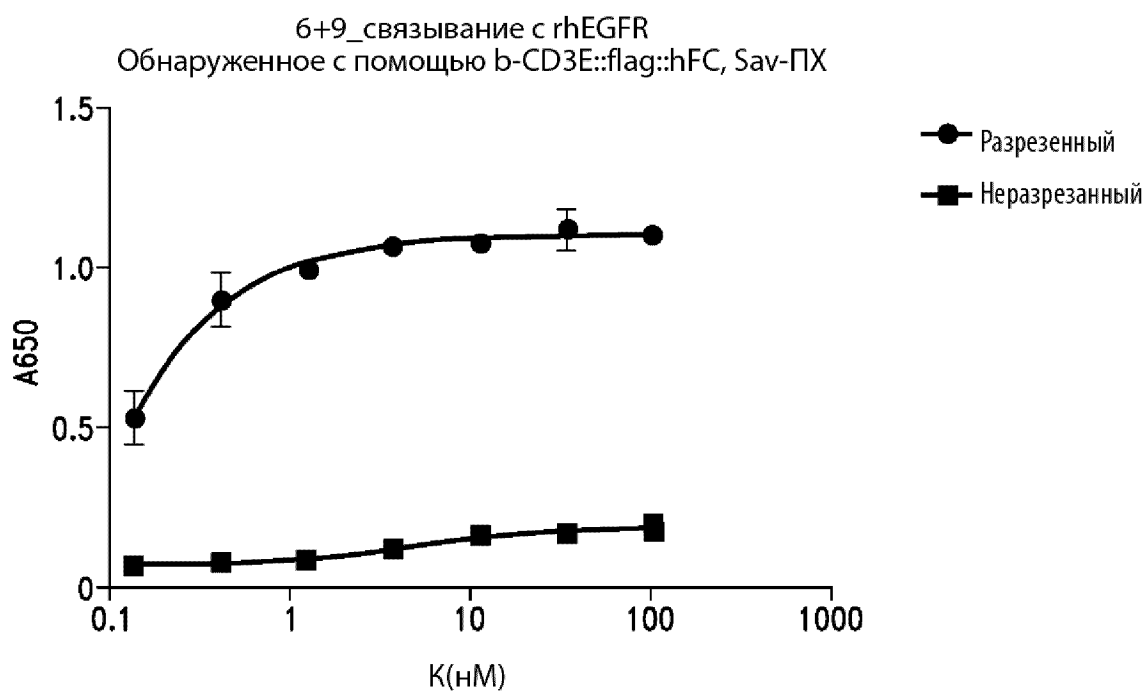
Фиг. 8D

Фиг. 9



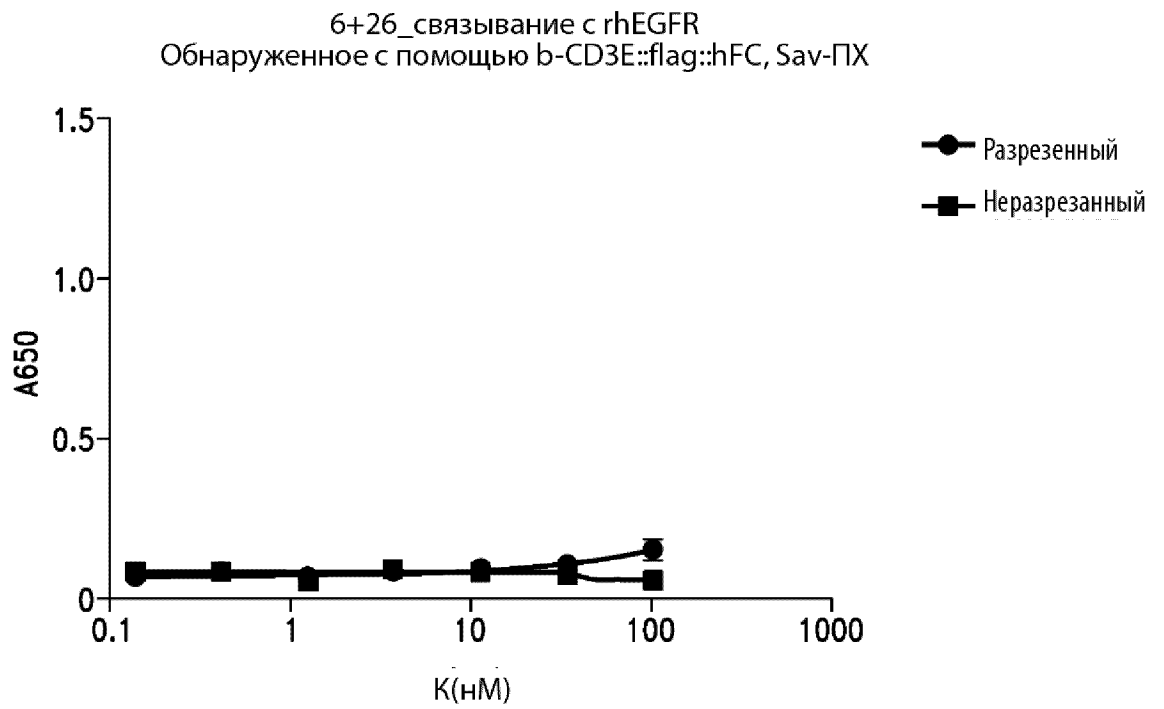


Фиг. 10А

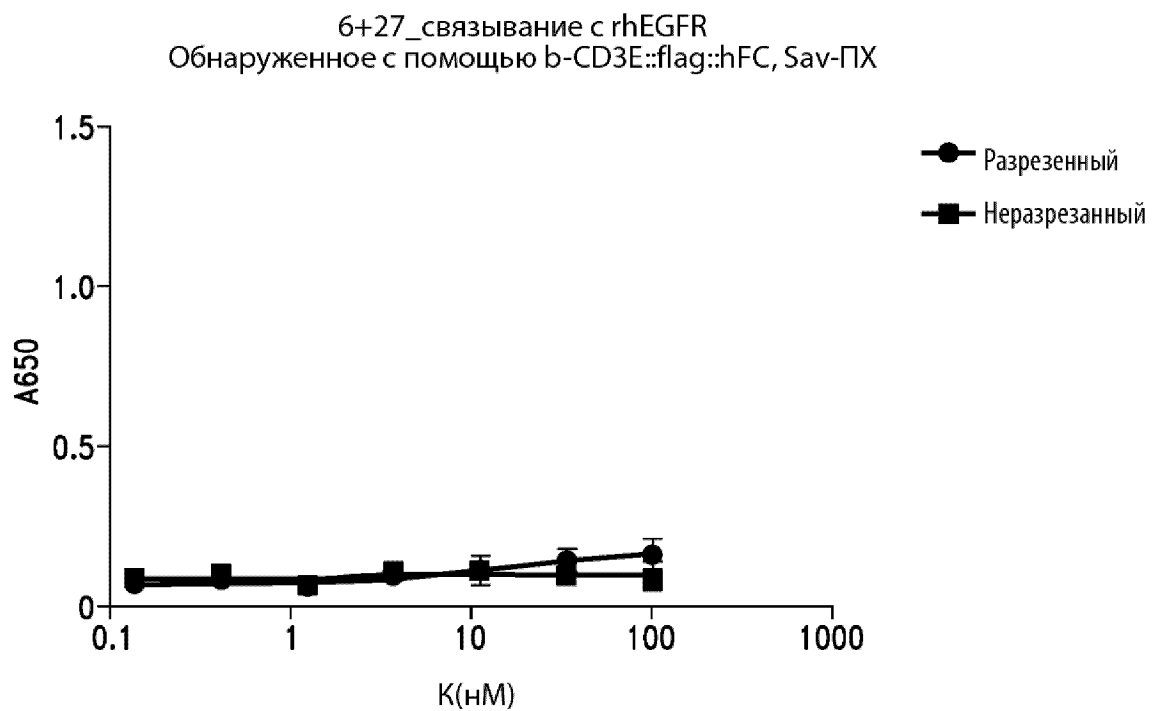


Фиг. 10В

21/105

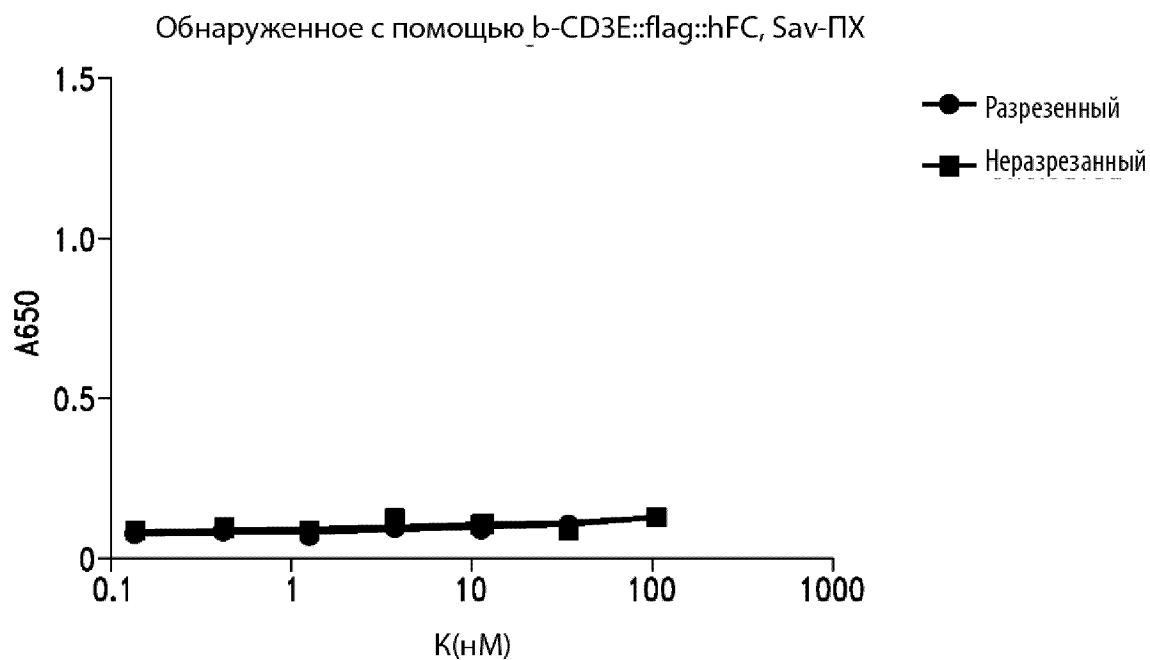


Фиг. 10C

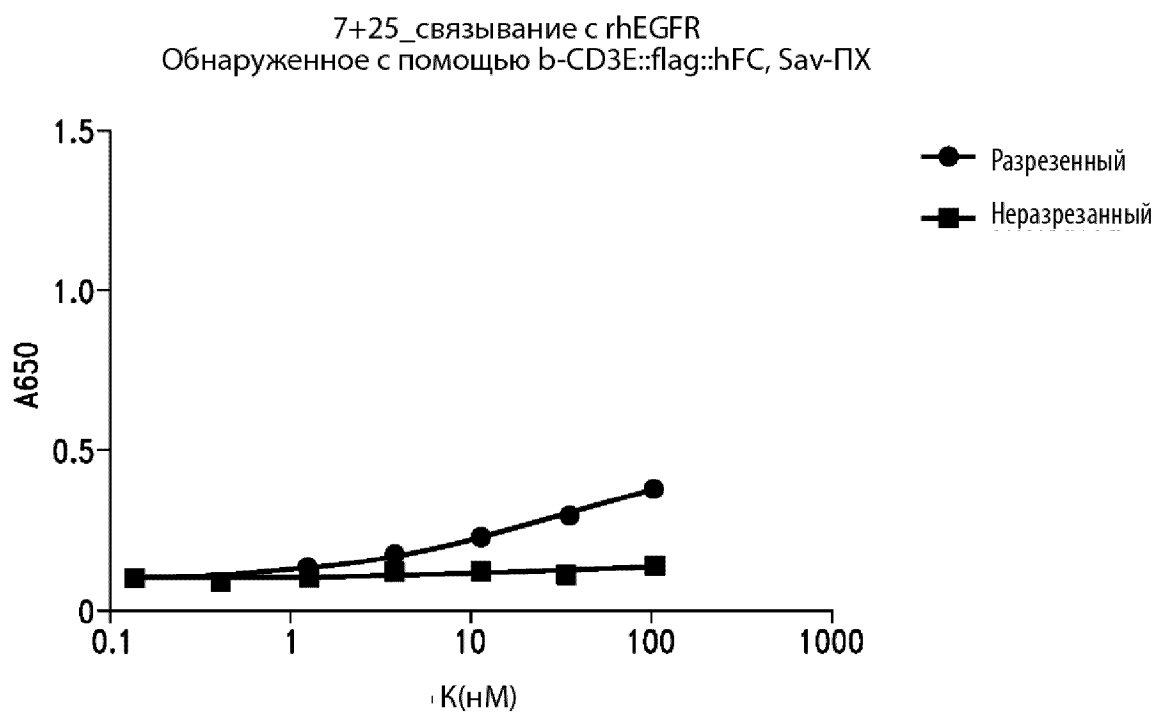


Фиг. 10D



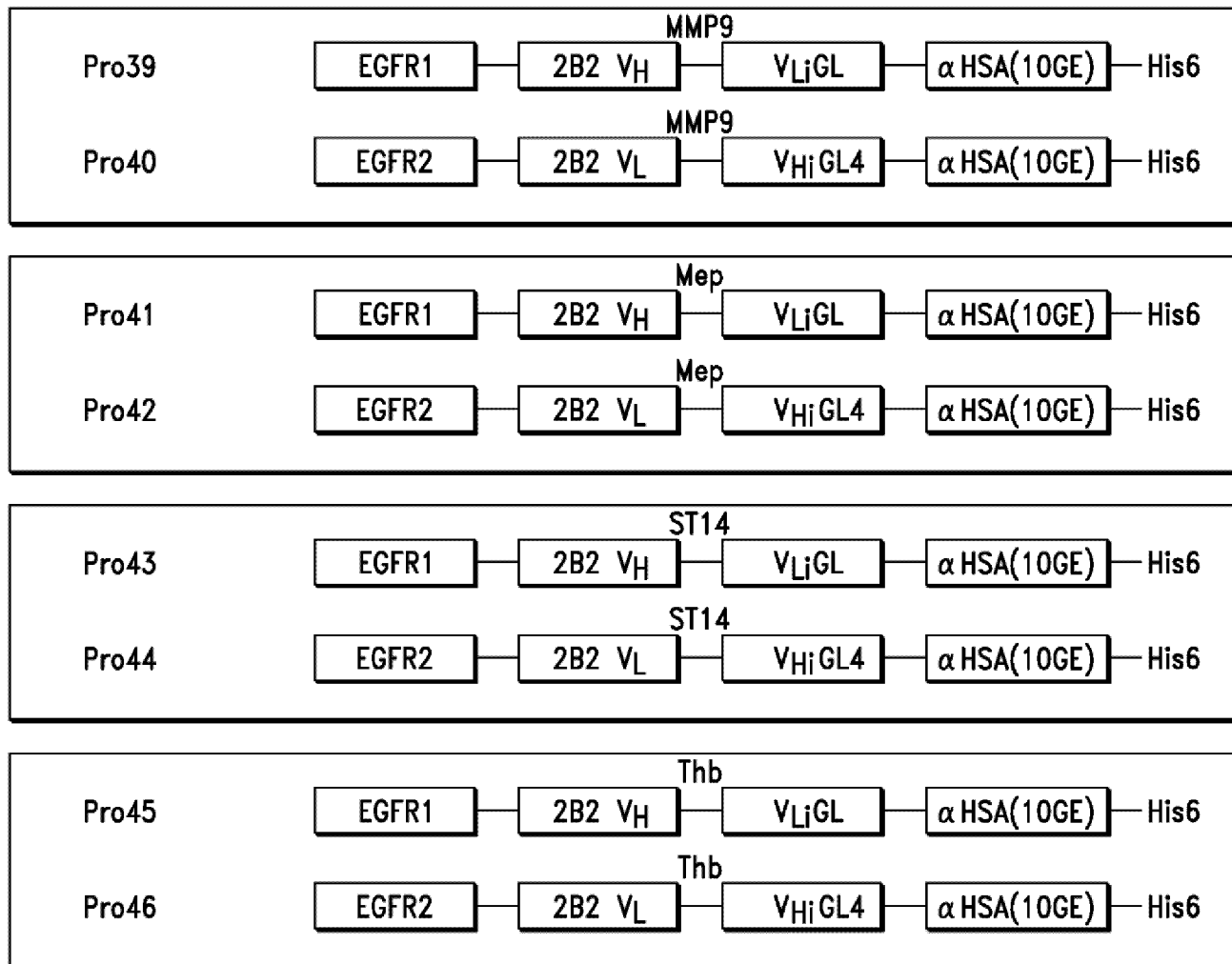


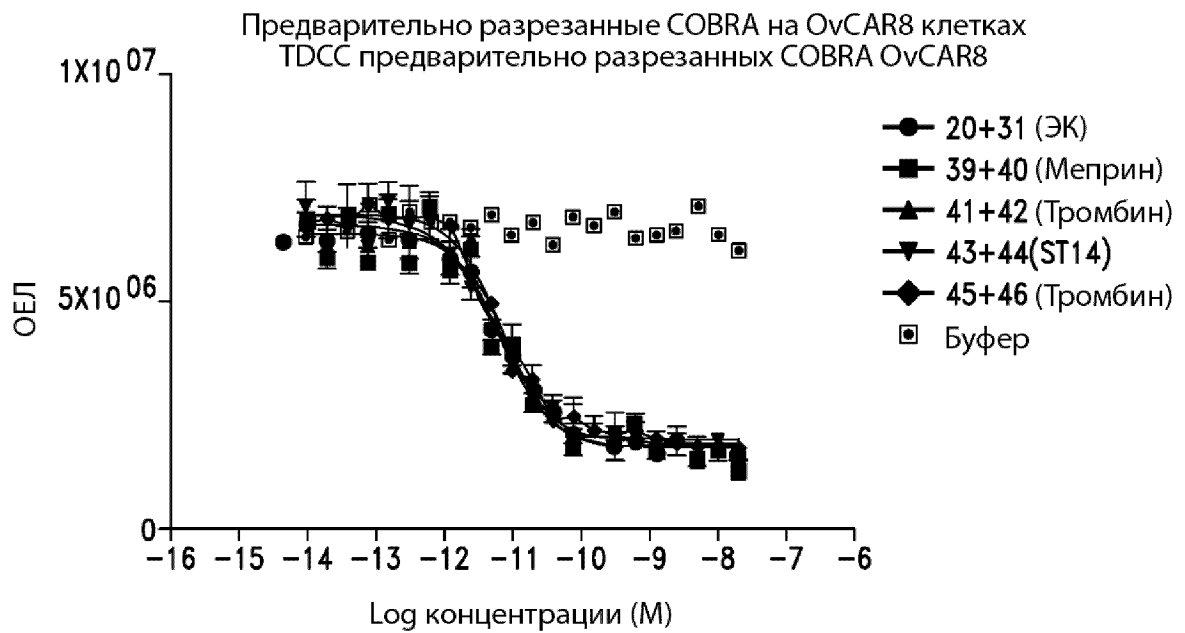
Фиг. 10Е



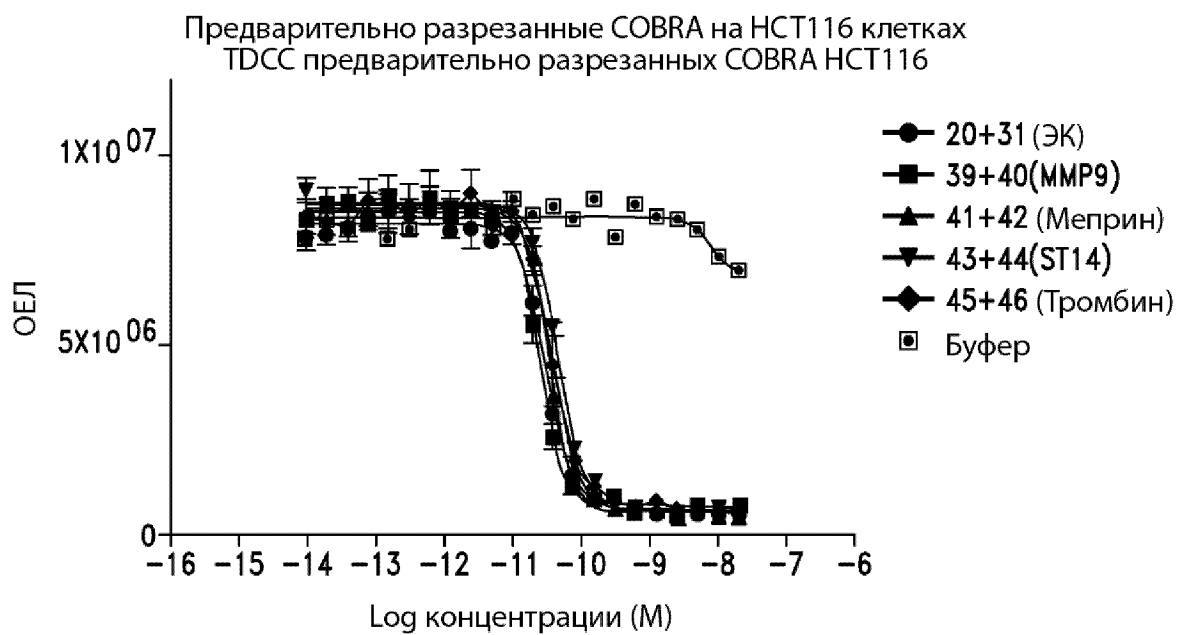
Фиг. 10F

Фиг. 11

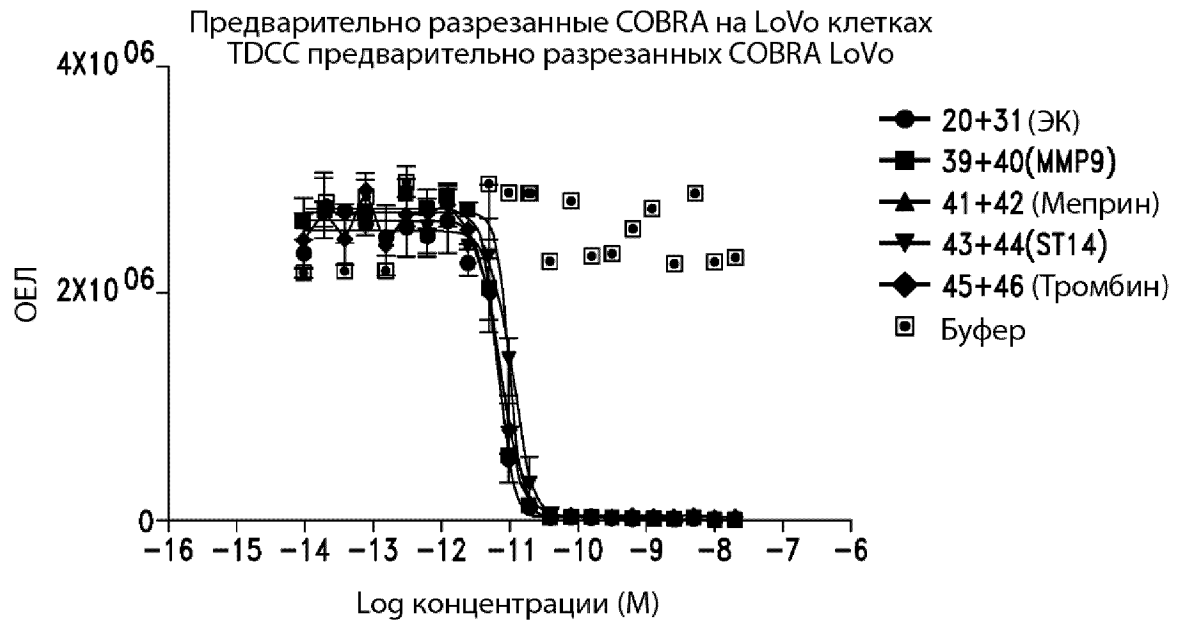




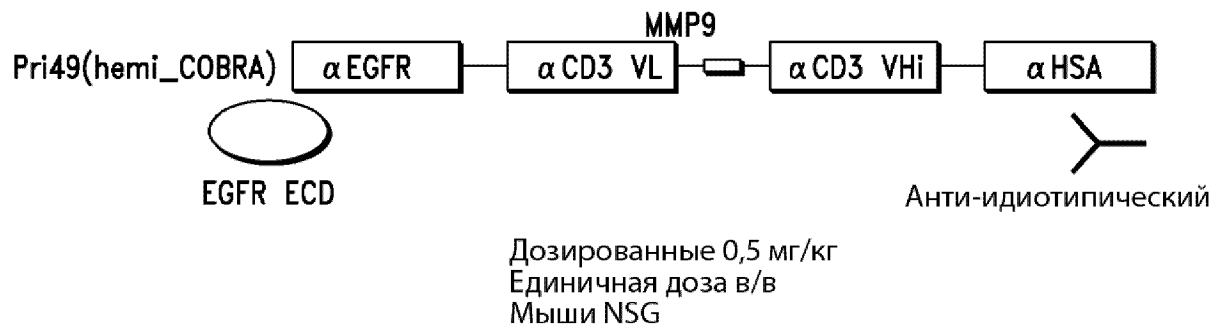
Фиг. 12А



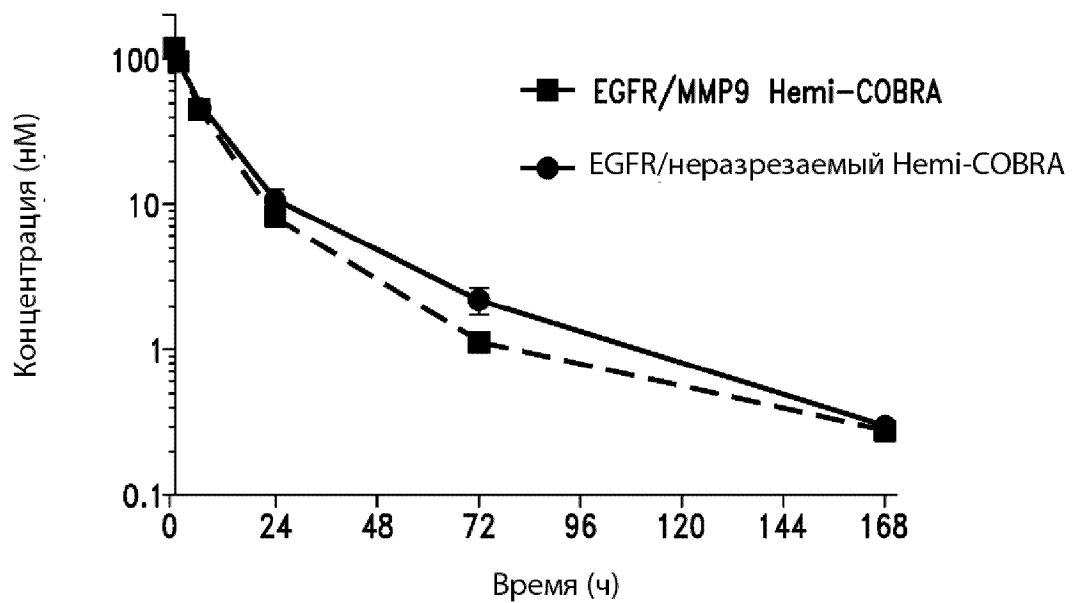
Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 13А

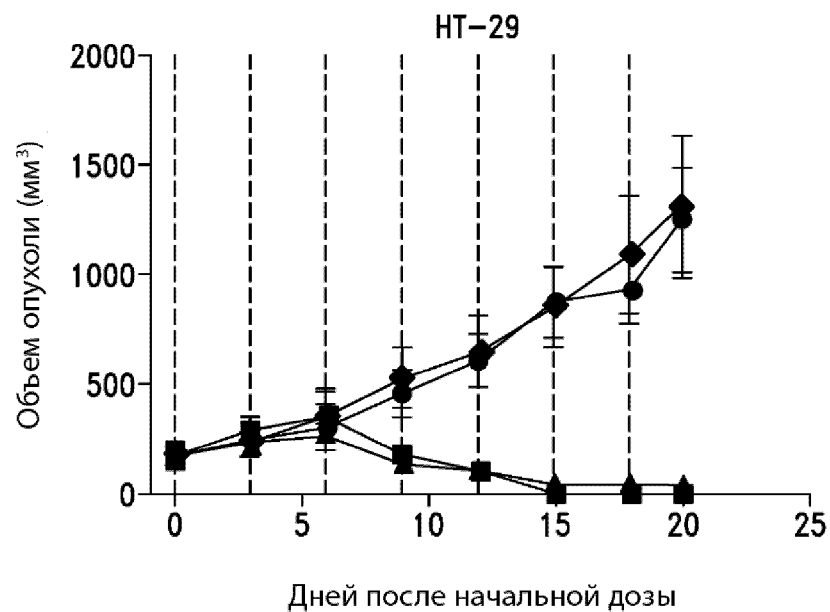
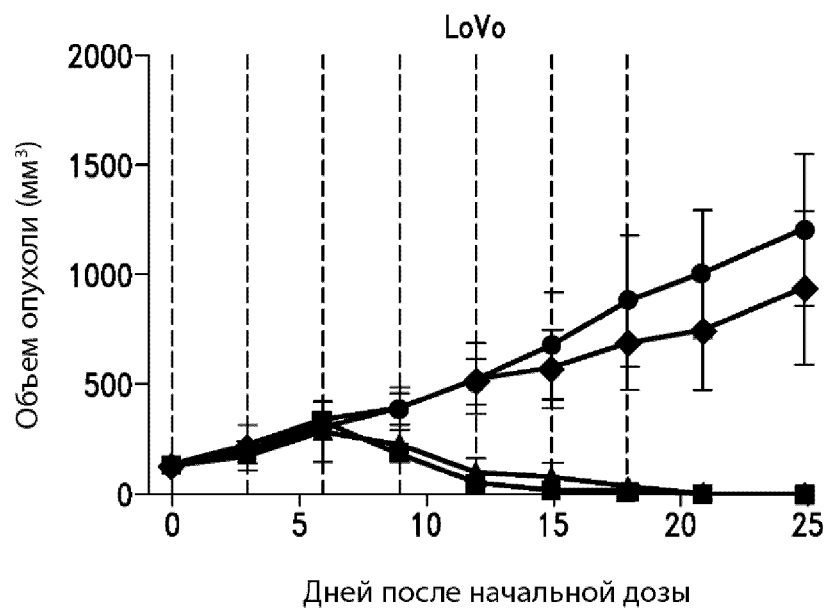


Фиг. 13В

Фиг. 14

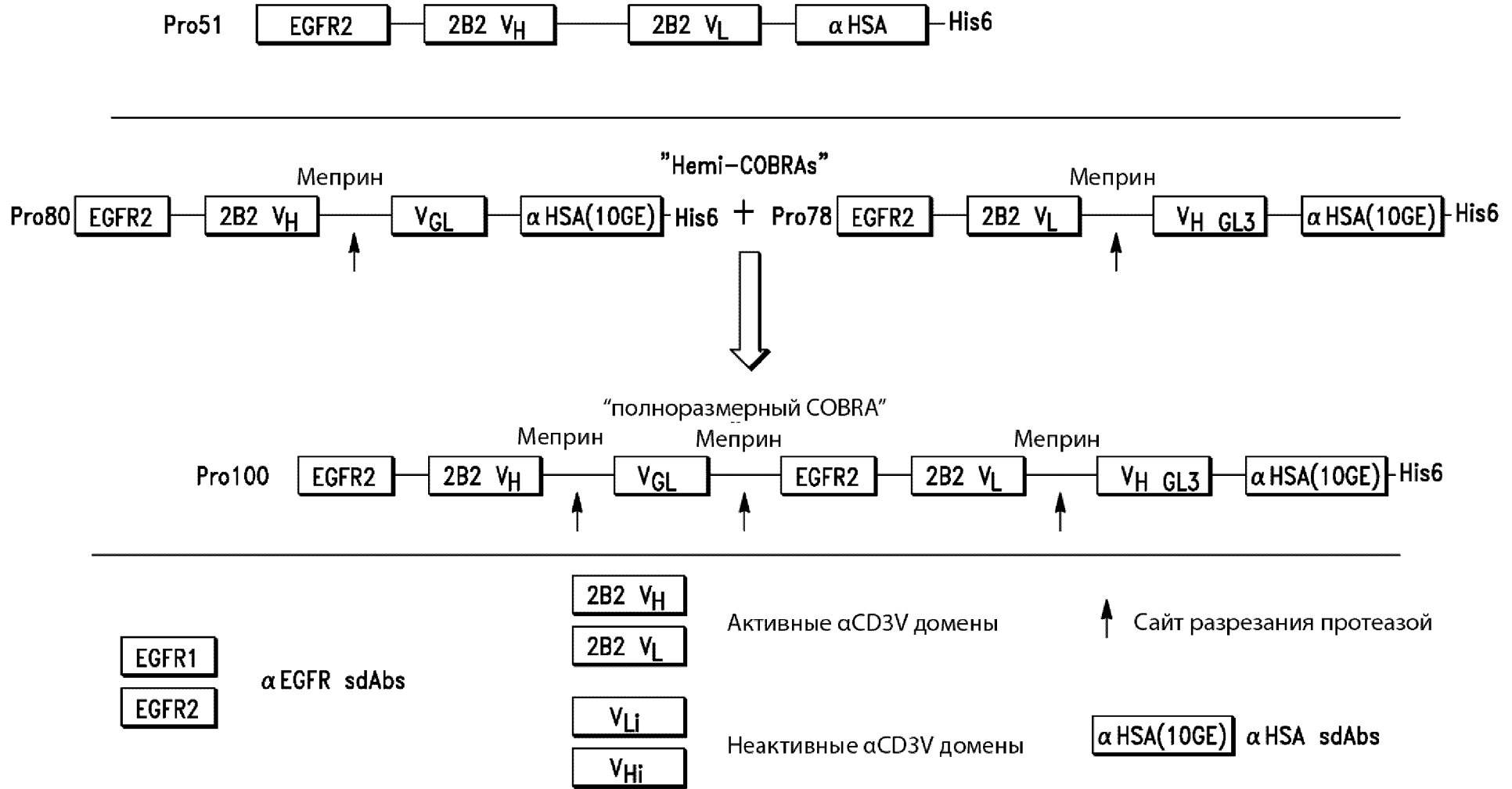


Фиг. 15



- Pro51 EGFR x CD3 0.2mpk
- Pro98 HEL x CD3 0.5mpk
- ▲ Pro77+Pro53 EGFR/MMP9 Hemi-COBRA, 0.5mpk каждый
- ◆ Pro74+Pro72 неразрезаемый Hemi-COBRA, 0.5mpk каждый

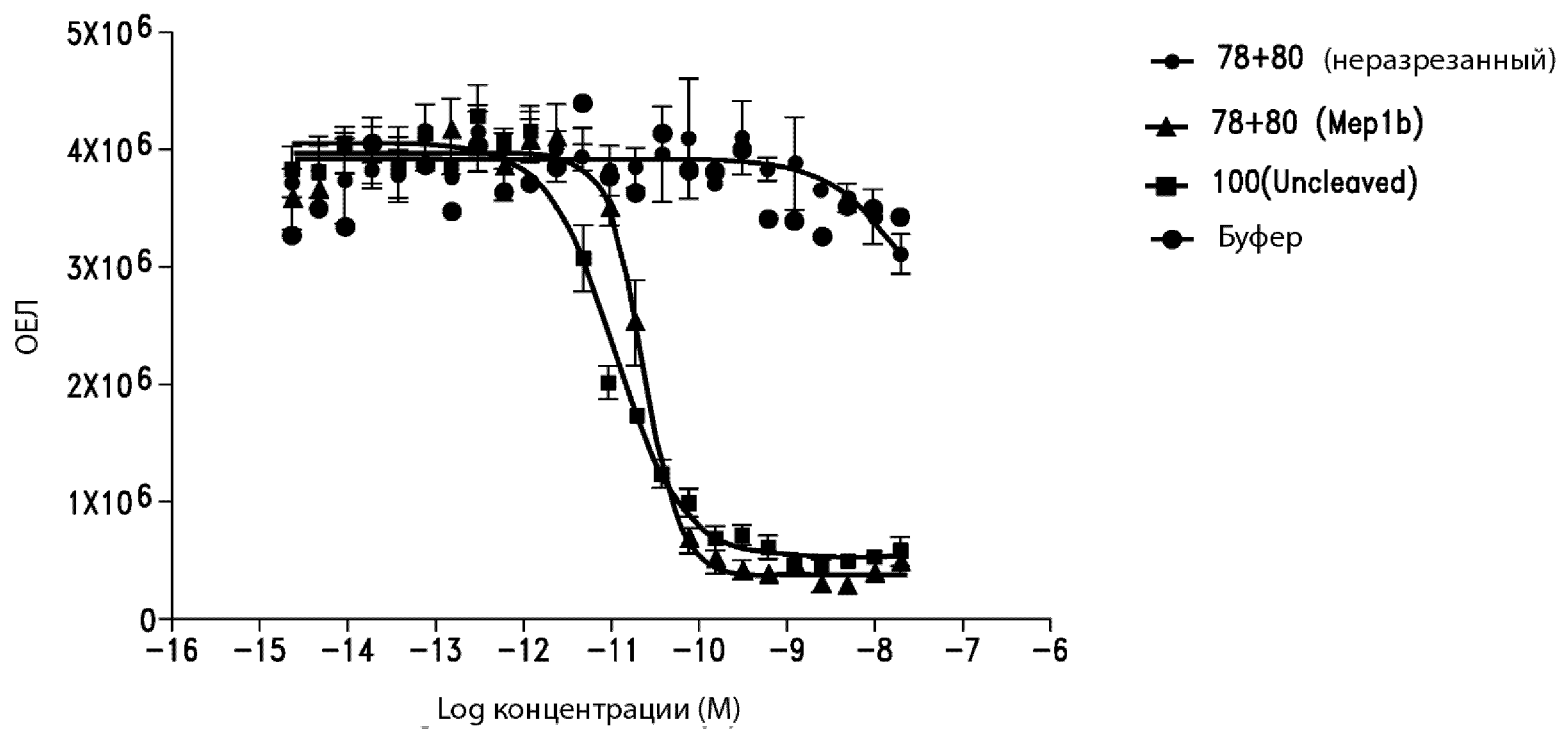
Фиг. 16



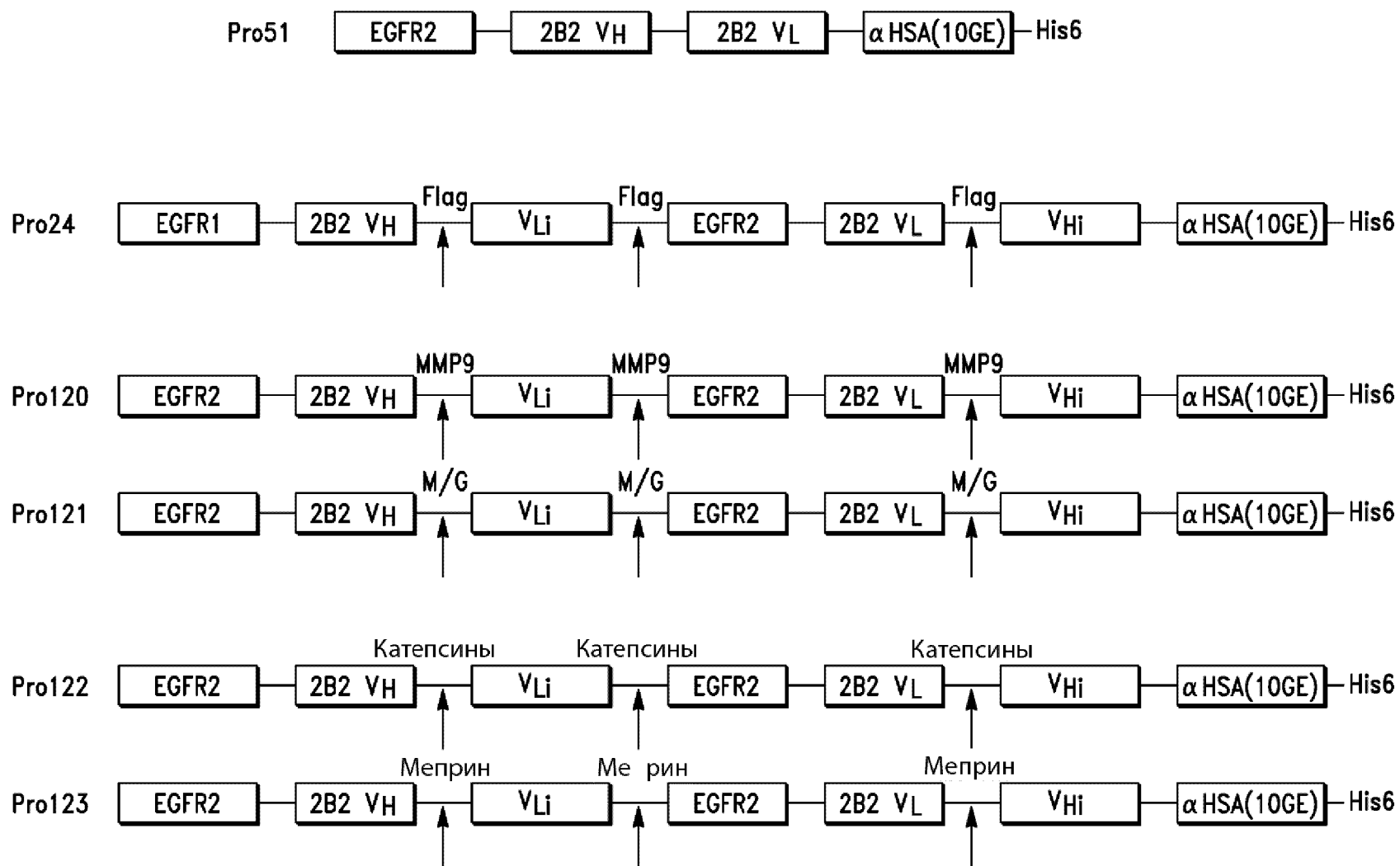
29/105



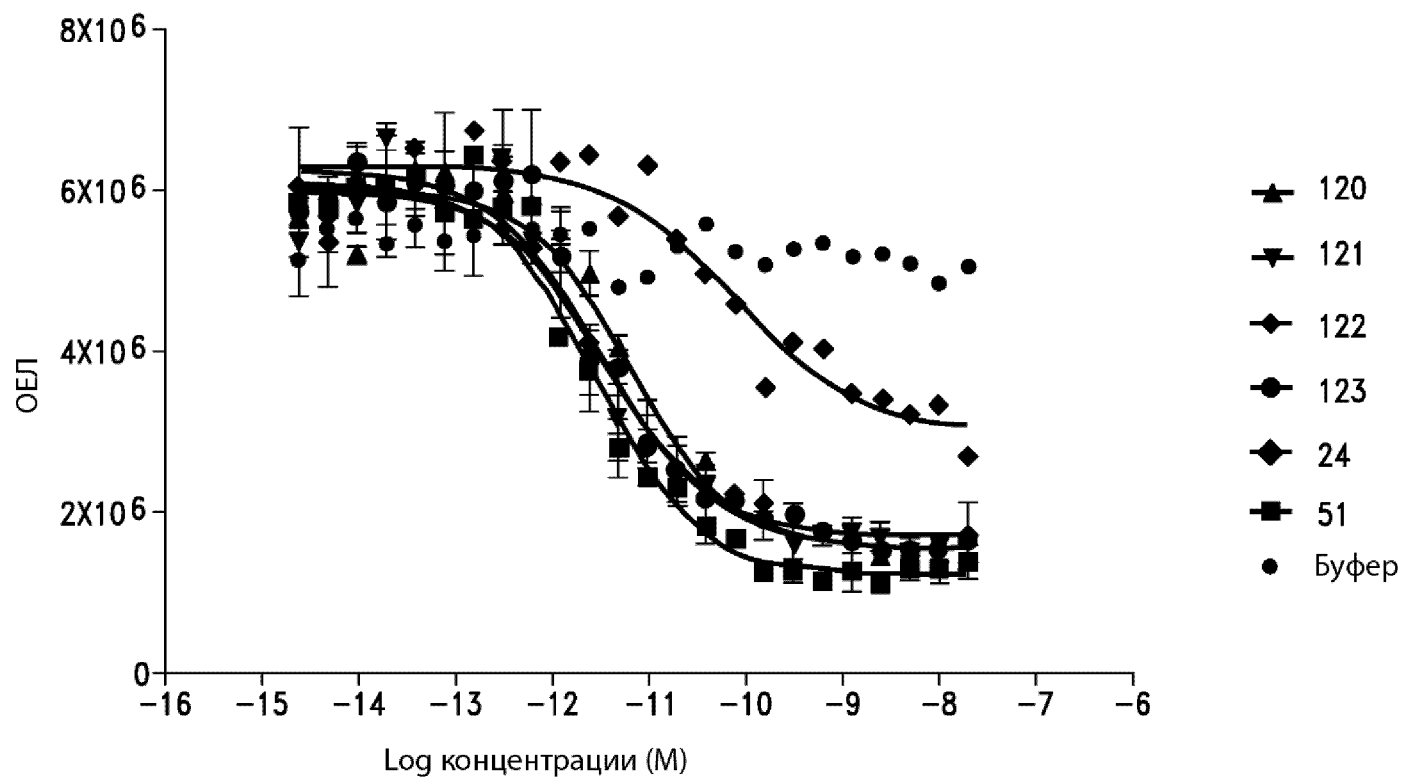
Фиг. 17



Фиг. 18

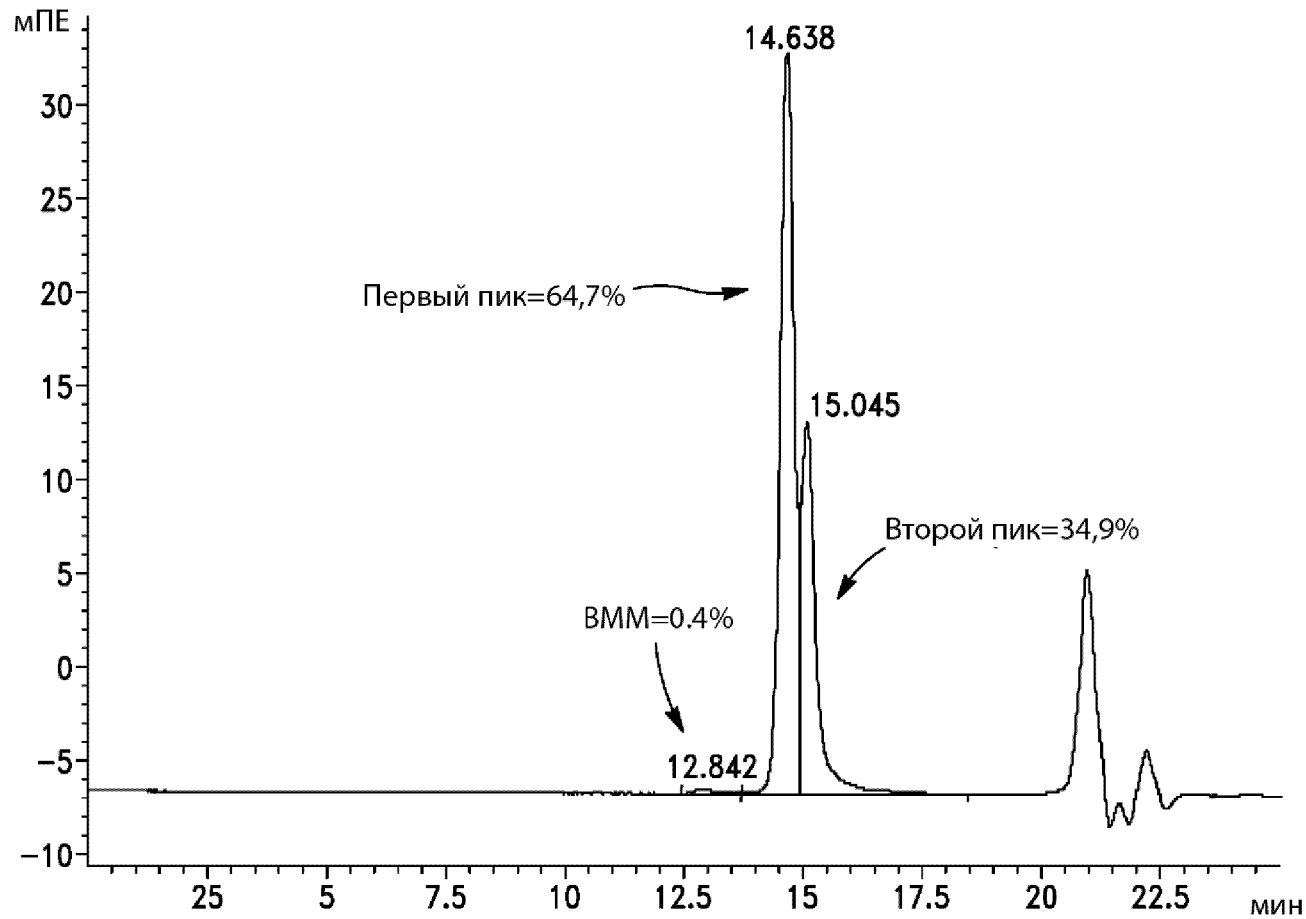


Фиг. 19



Фиг. 20

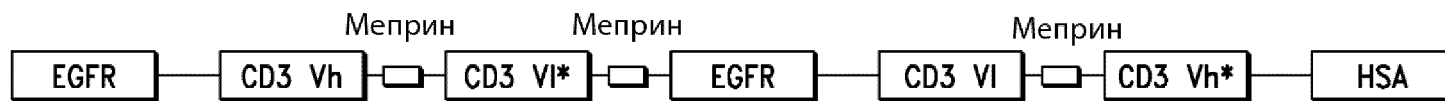
DAD1A, Sig=280, 16 Ref=выкл (JK171020Pro 123MonoS пики/006-P1-A6-Pro123 lot 486 нефракционированный.D)



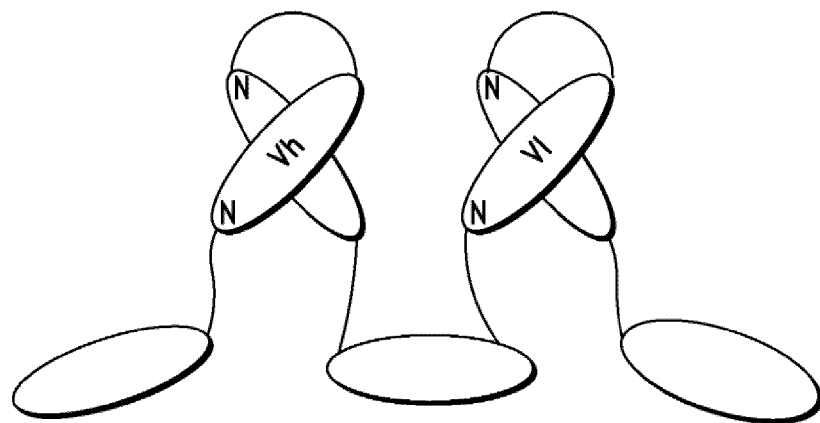
Pro123

33/105

Фиг. 21



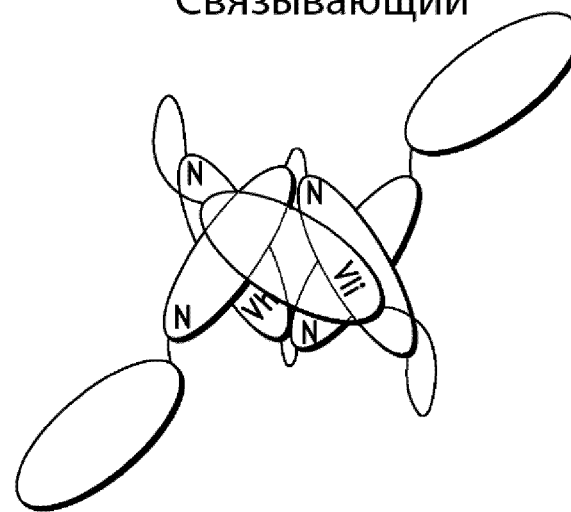
Несвязывающий



Бивалентный scFv

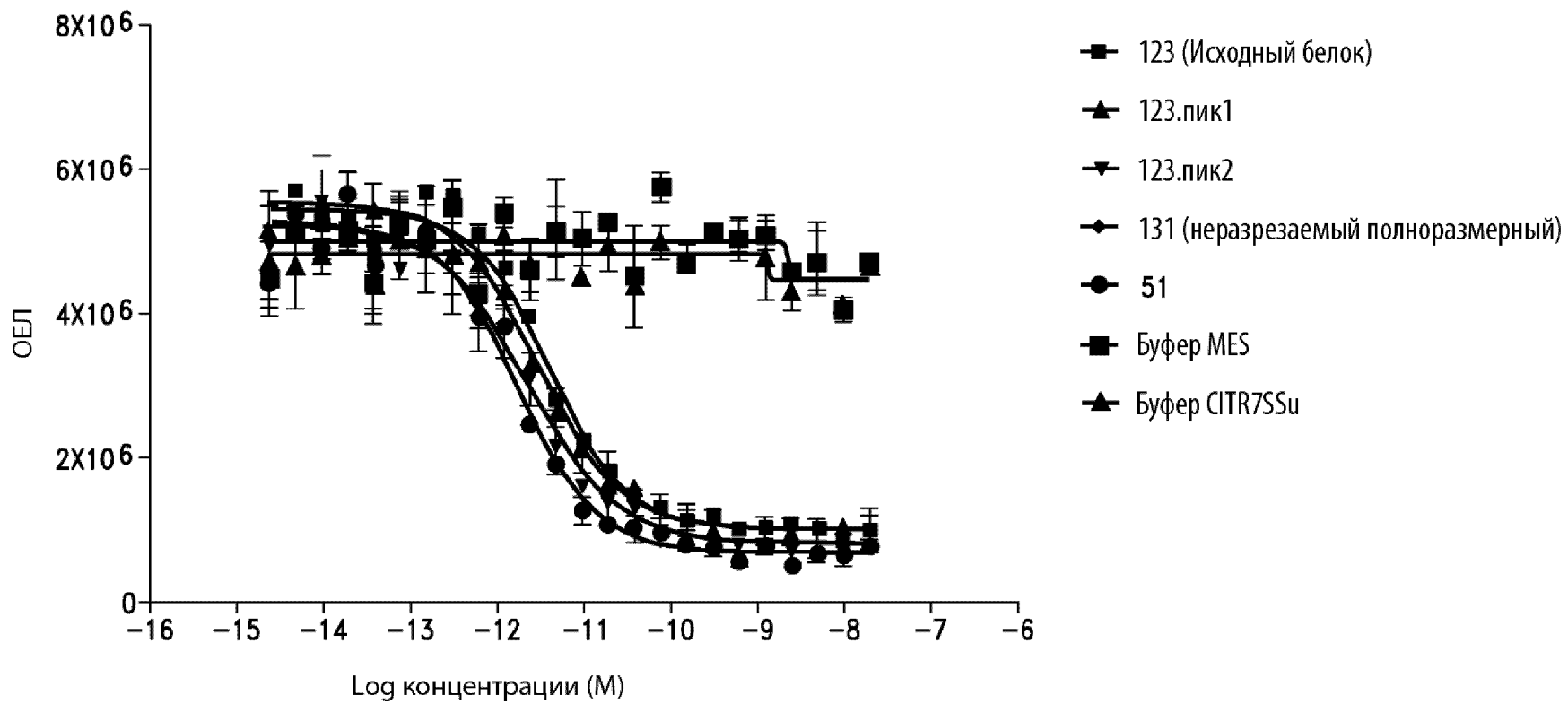
И

Связывающий

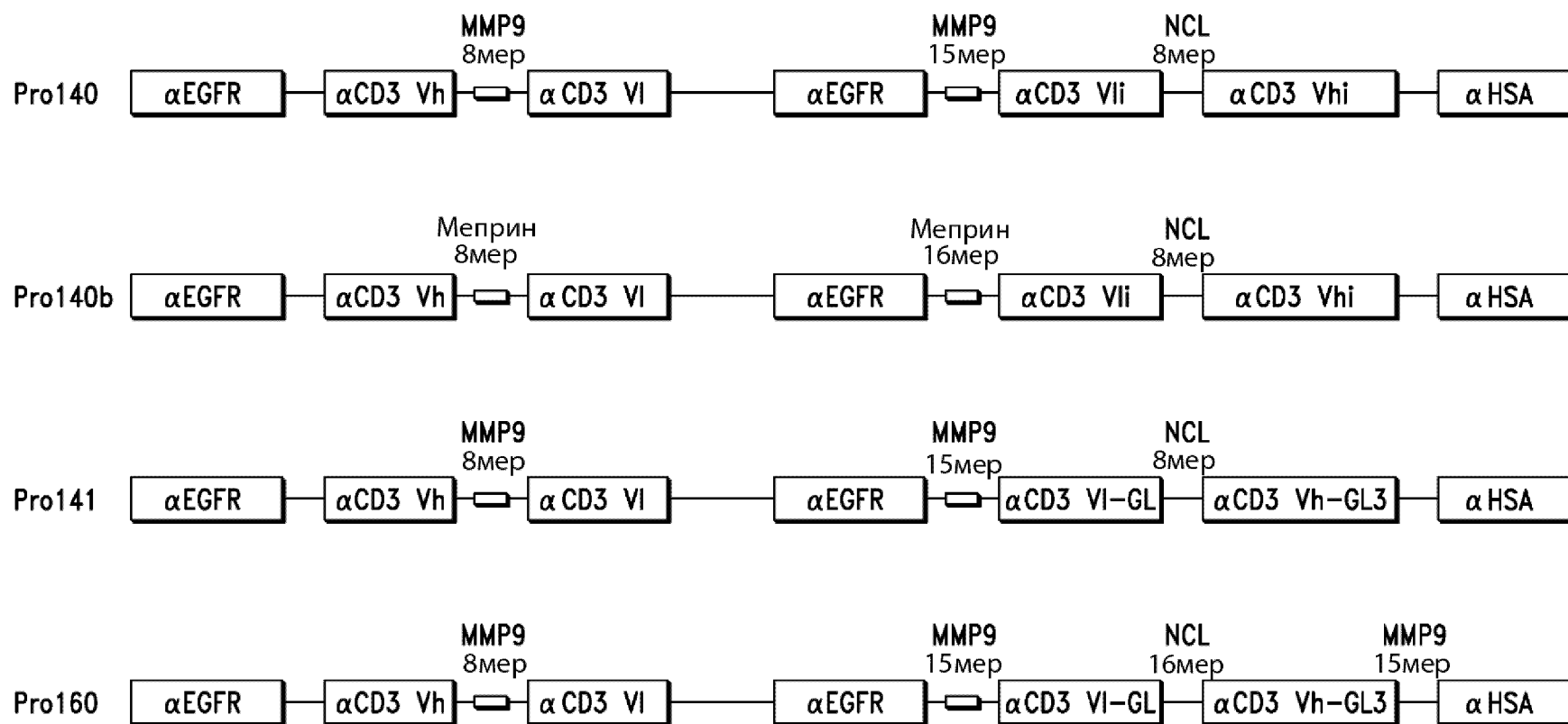


Одноцепочечное антитело

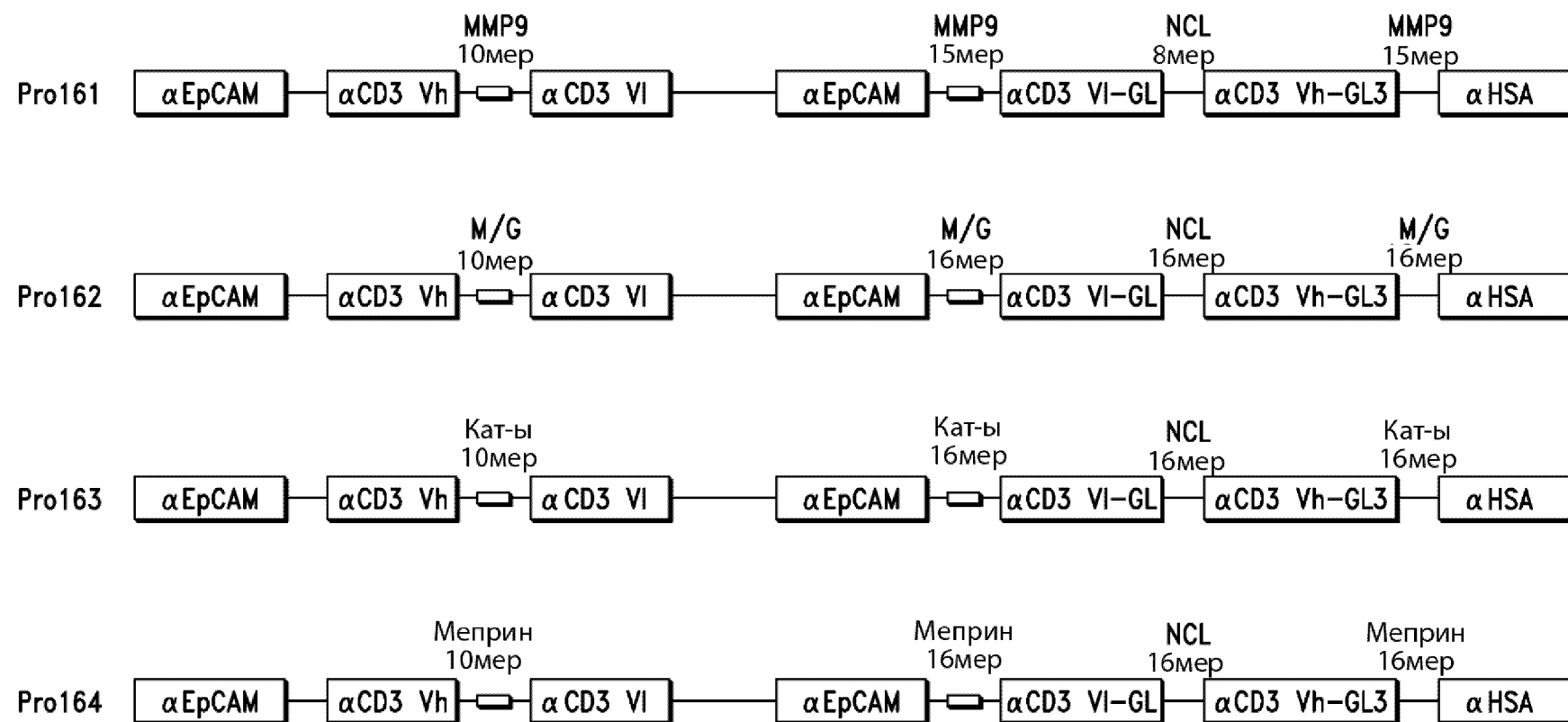
Фиг. 22



Фиг. 23А

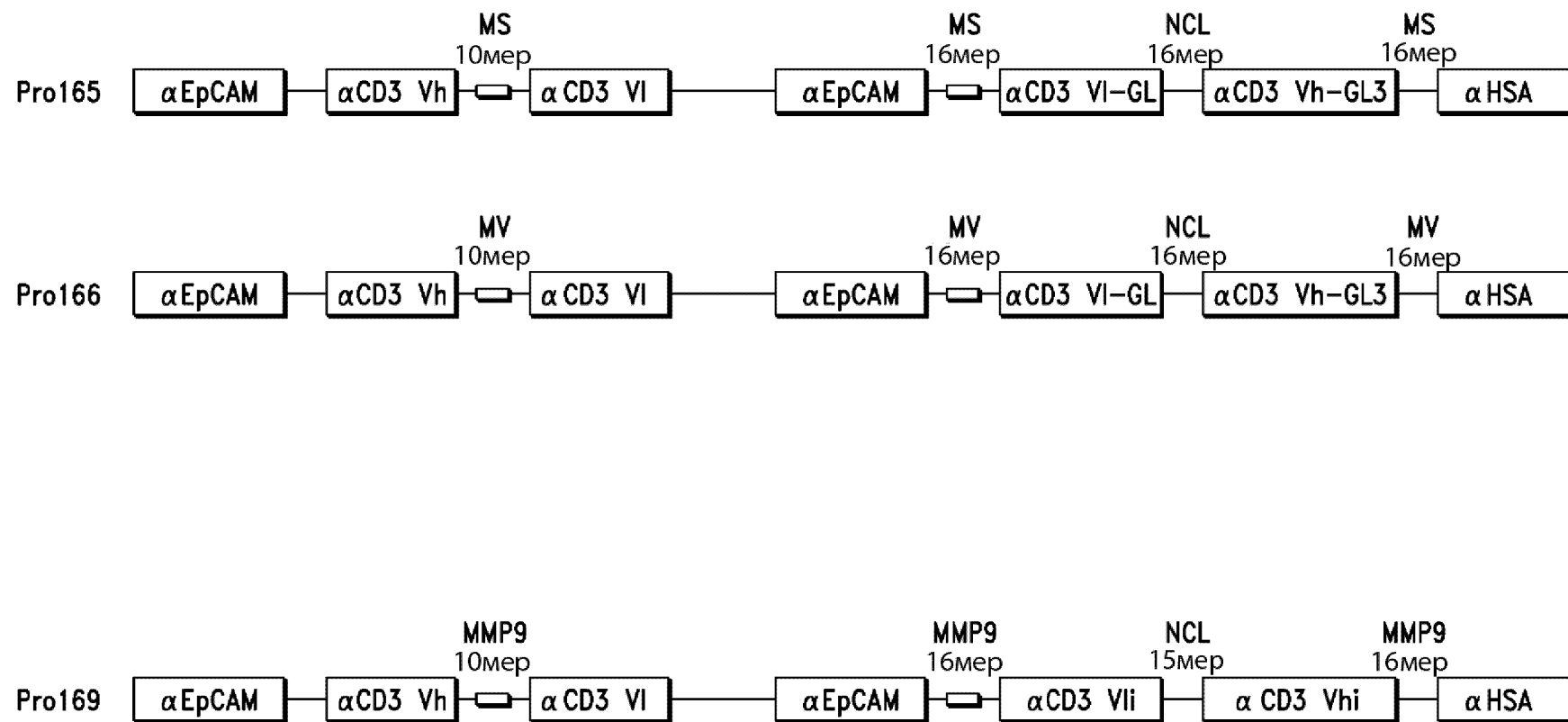


Фиг. 23В

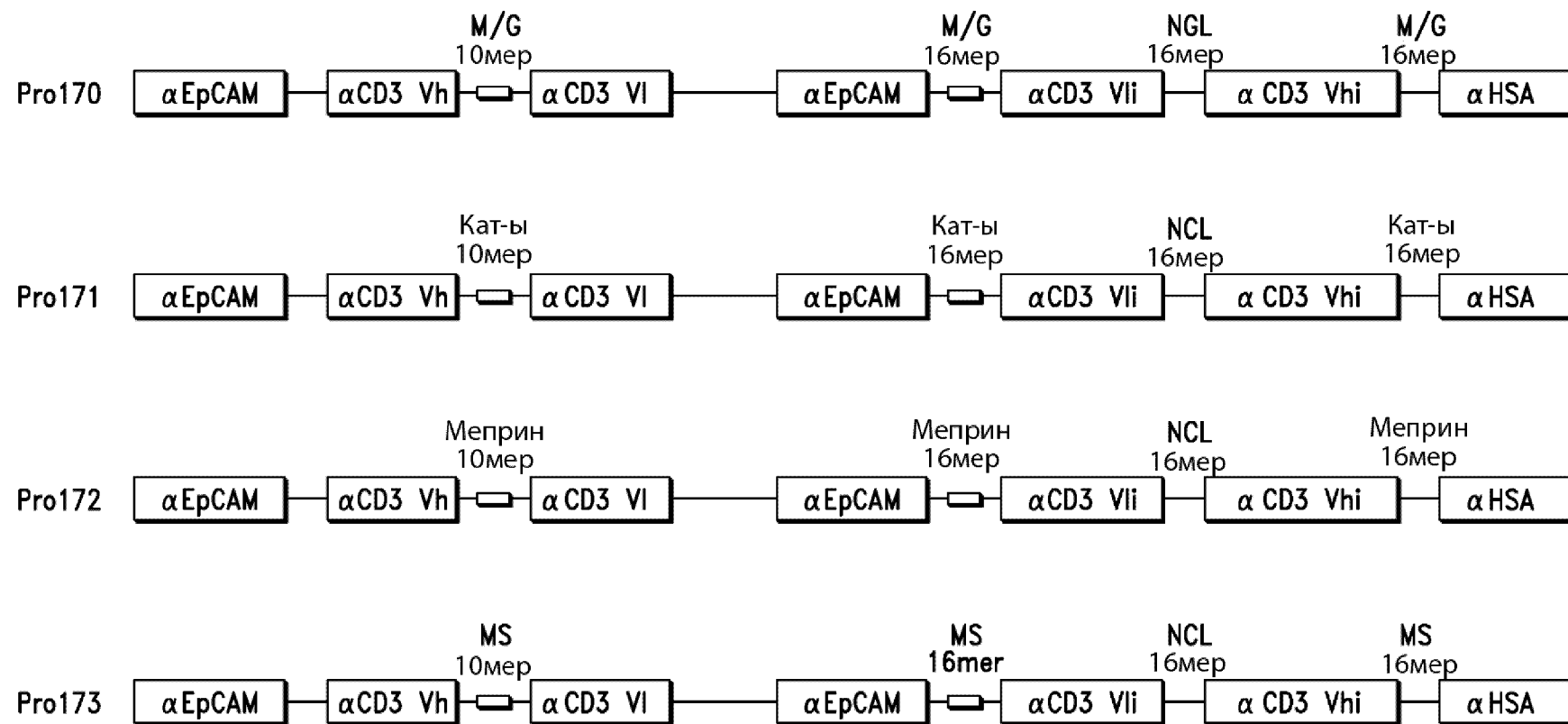




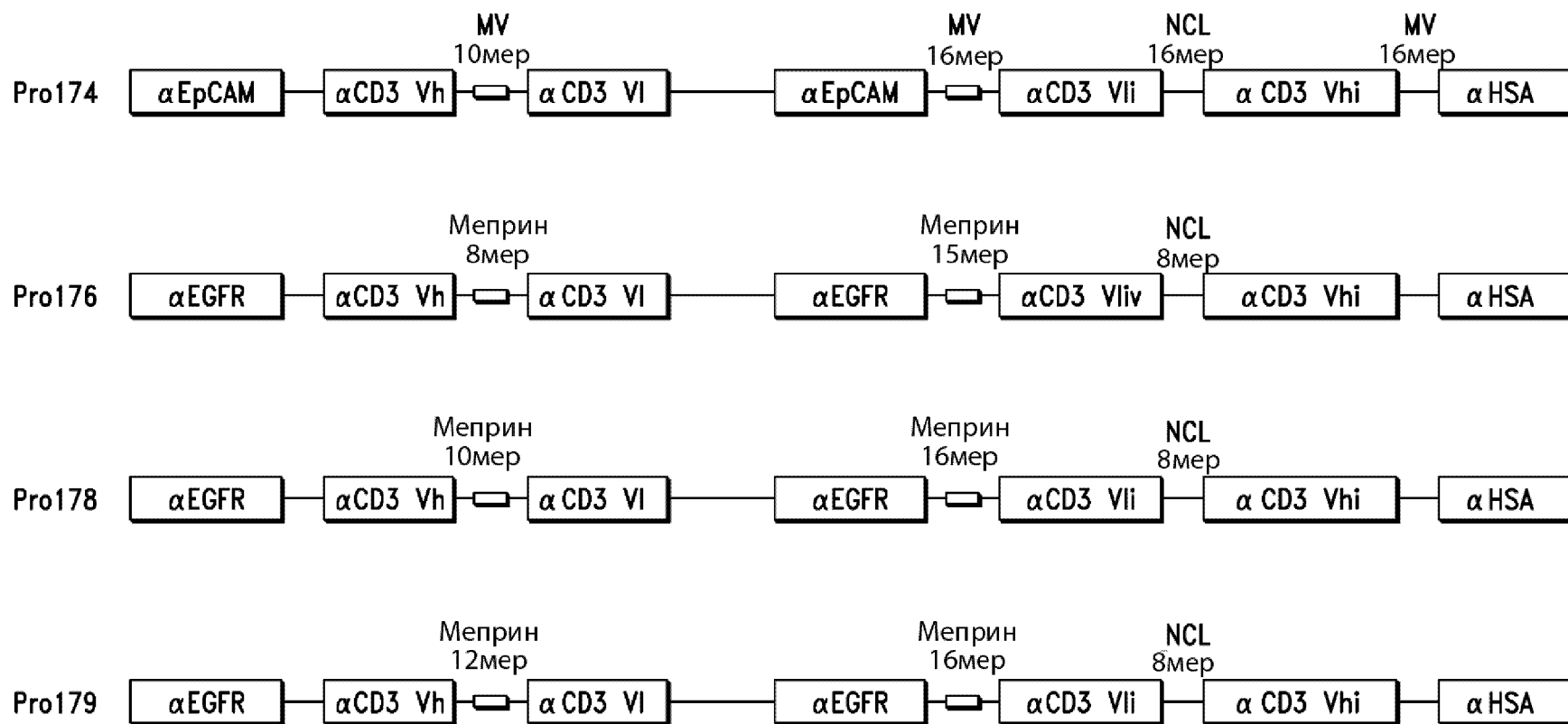
Фиг. 23С



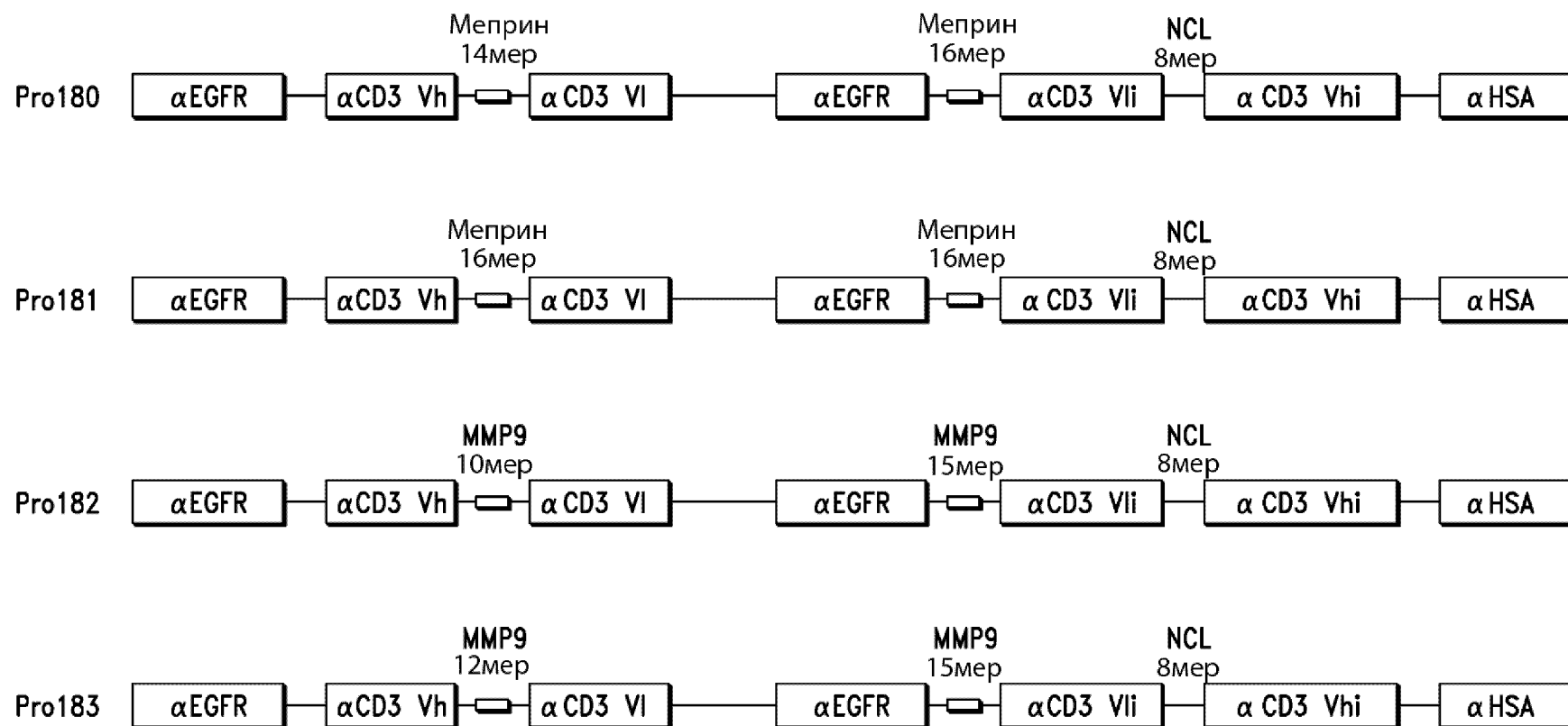
Фиг. 23D



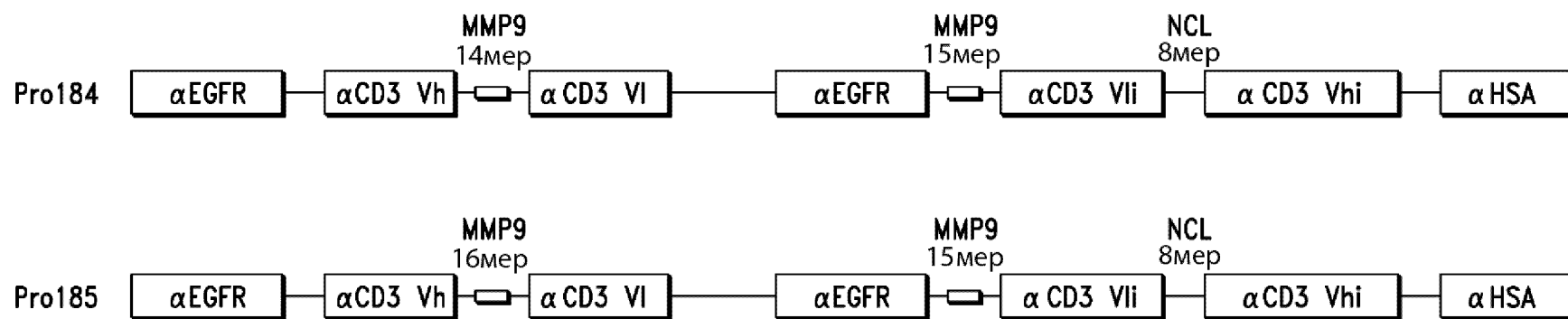
Фиг. 23Е



Фиг. 23F

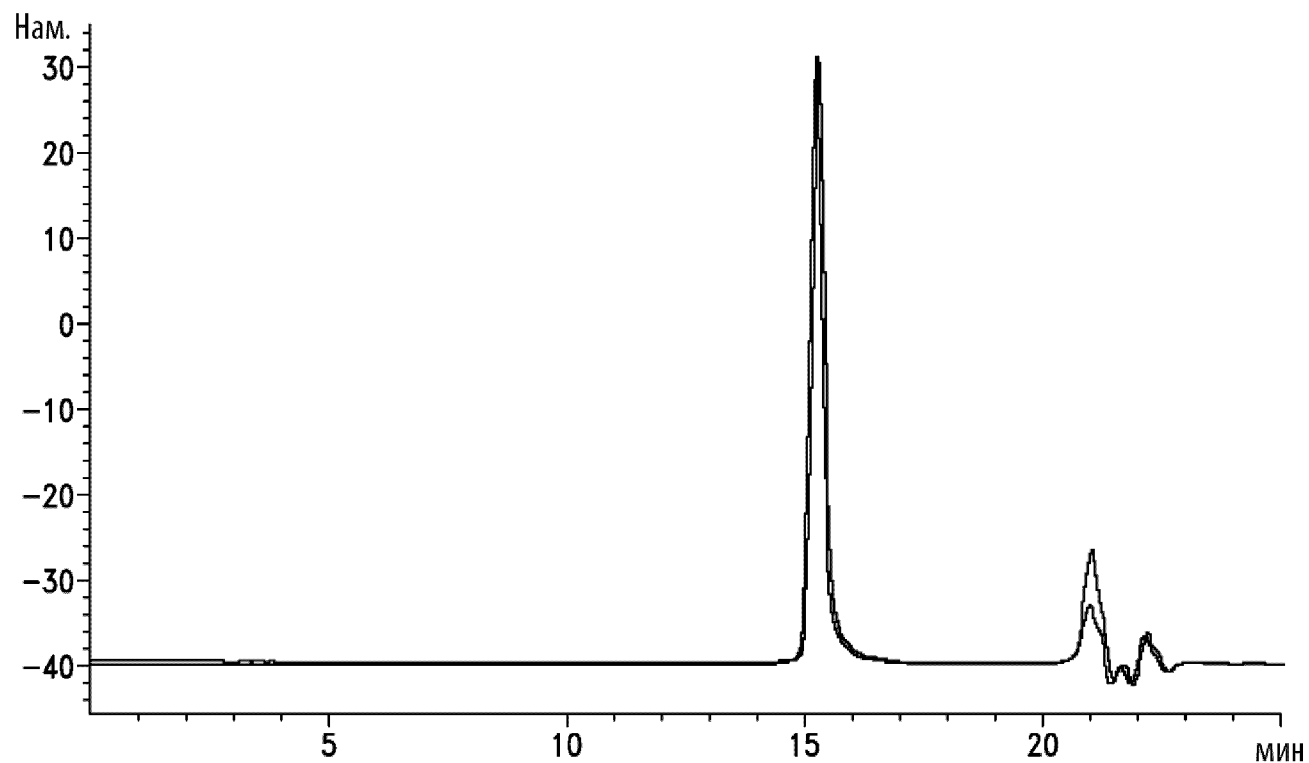


Фиг. 23G

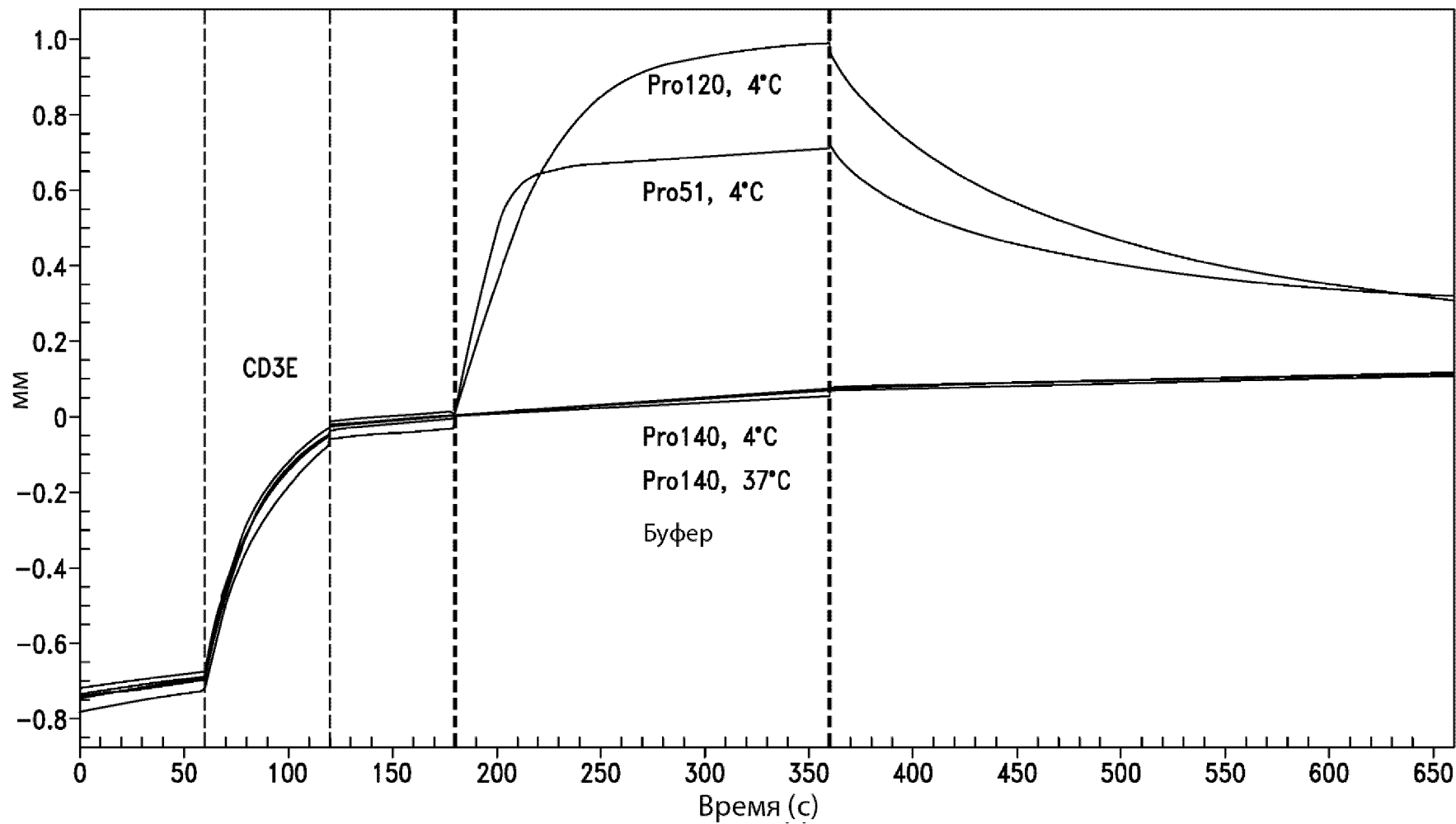


Фиг. 24

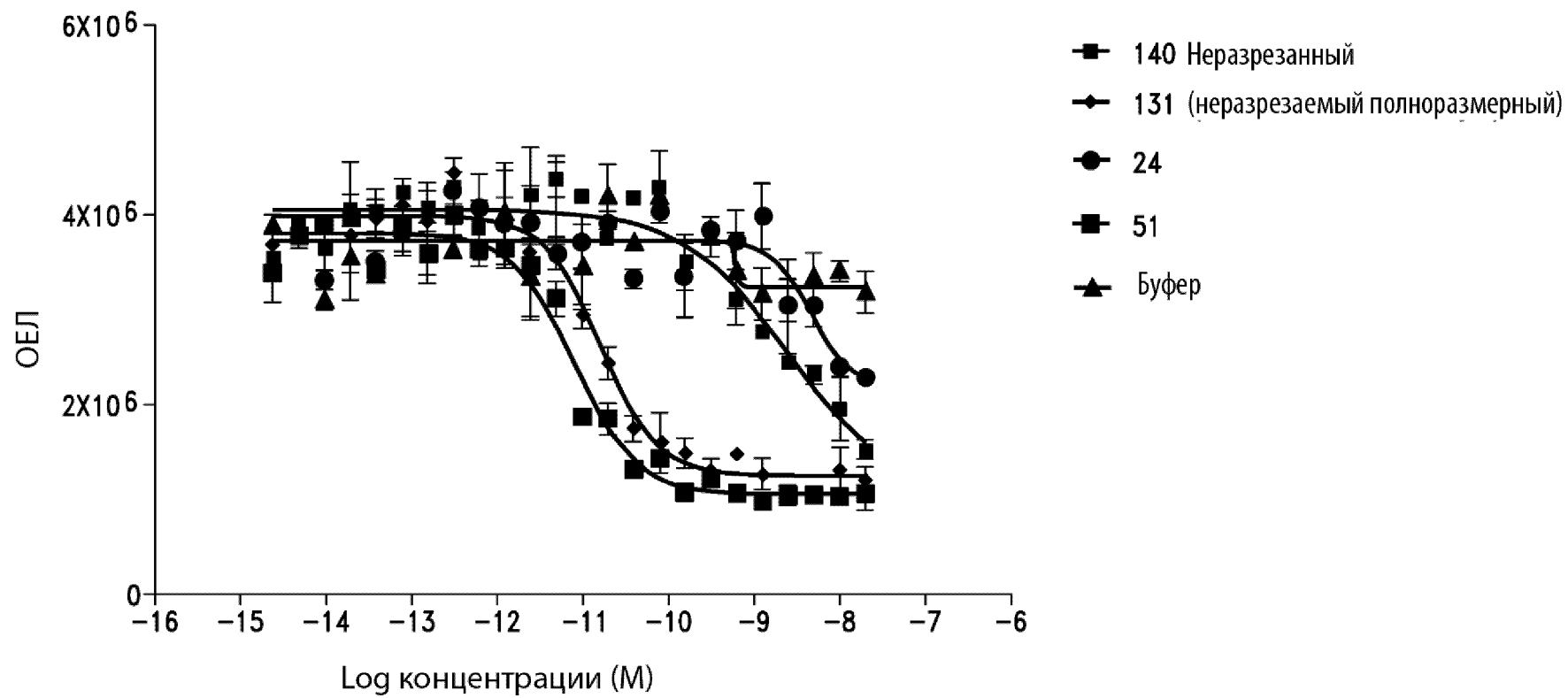
DAD1A,Sig=280,16 Ref=Выкл(C:\CHEM32\...ATA\JK171027 SEC LOTS 503 TO 508\003-P1-A4PRO lot PL-0506.D0 4°C  
DAD1A,Sig=280,16 Ref=Выкл(JK17 1030 Pro140 и 41 и 42 при 37\003-P1-A4-Pro 140at 37 C.D) 37°C 72 ч :



Фиг. 25



Фиг. 26

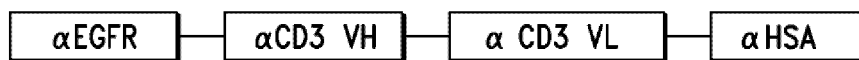




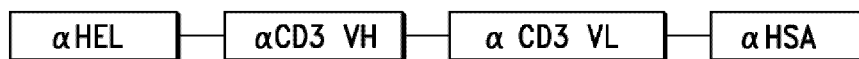
Фиг. 27

Группы:

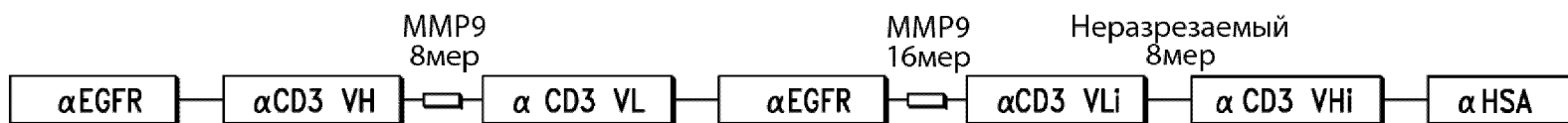
Позитивный контроль  
EGFRxCD3  
Pro51

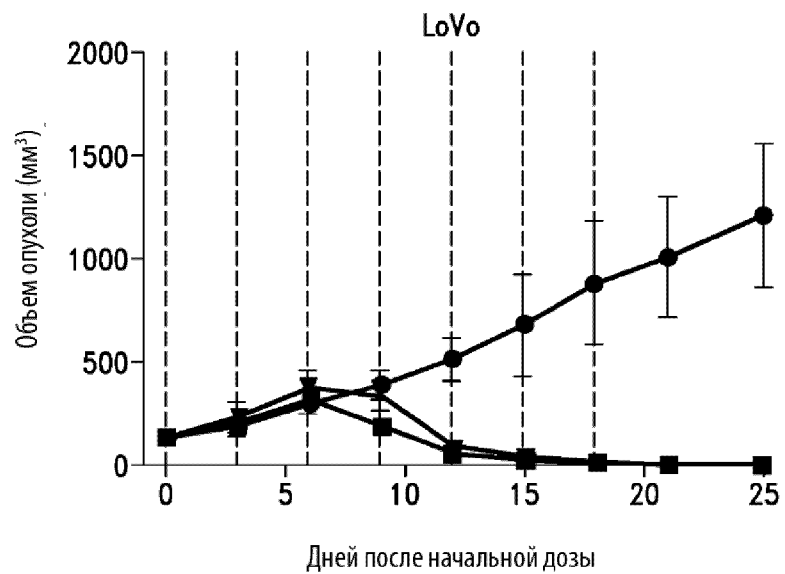


Негативный контроль  
HELxCD3  
Pro98

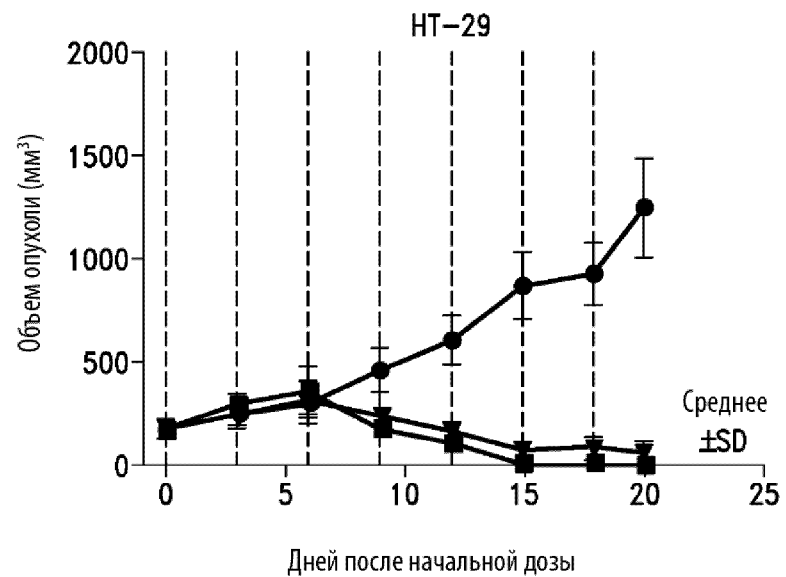


MMP9/EGFR  
COBRA 140



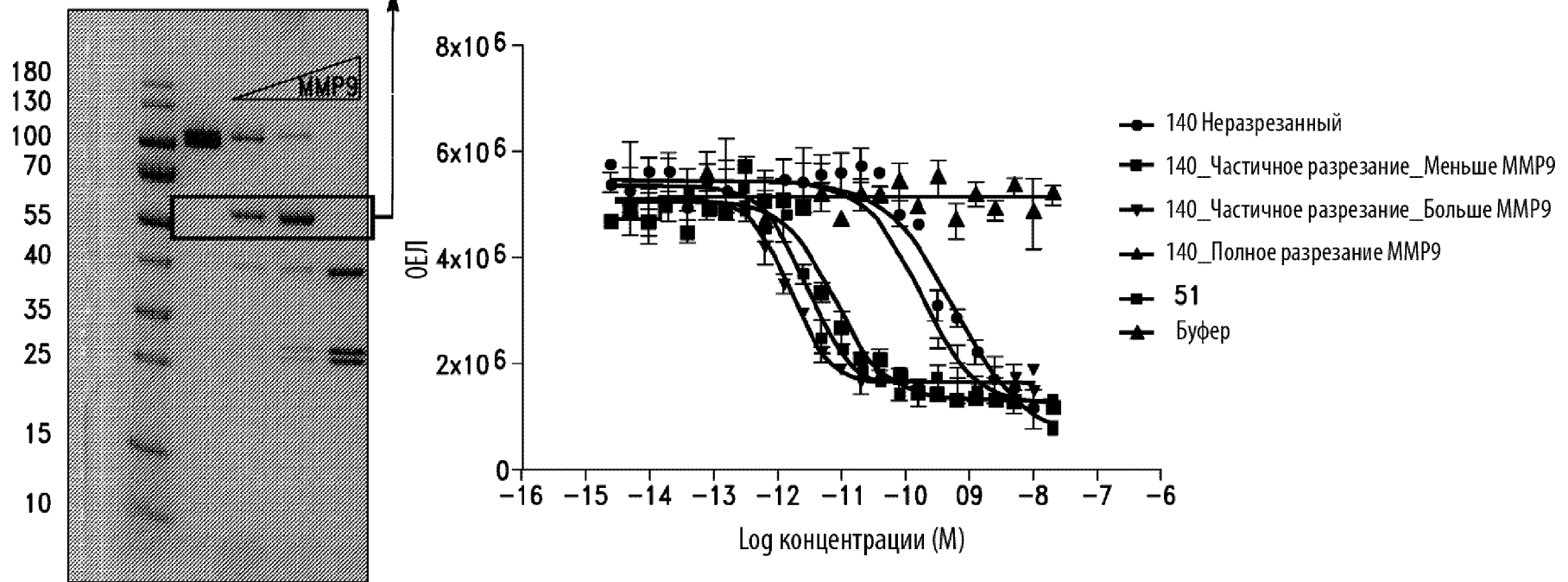
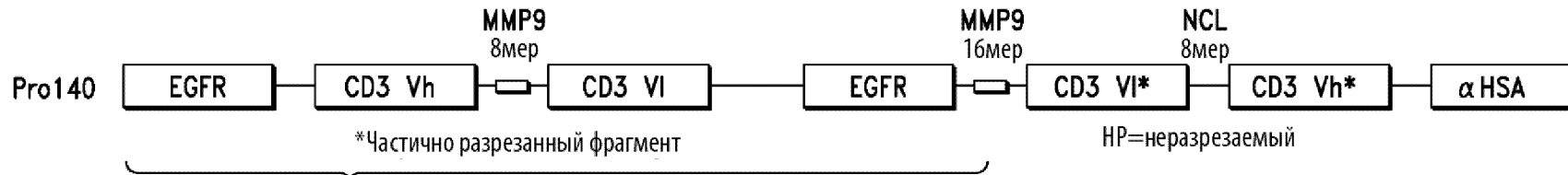


Фиг. 28А



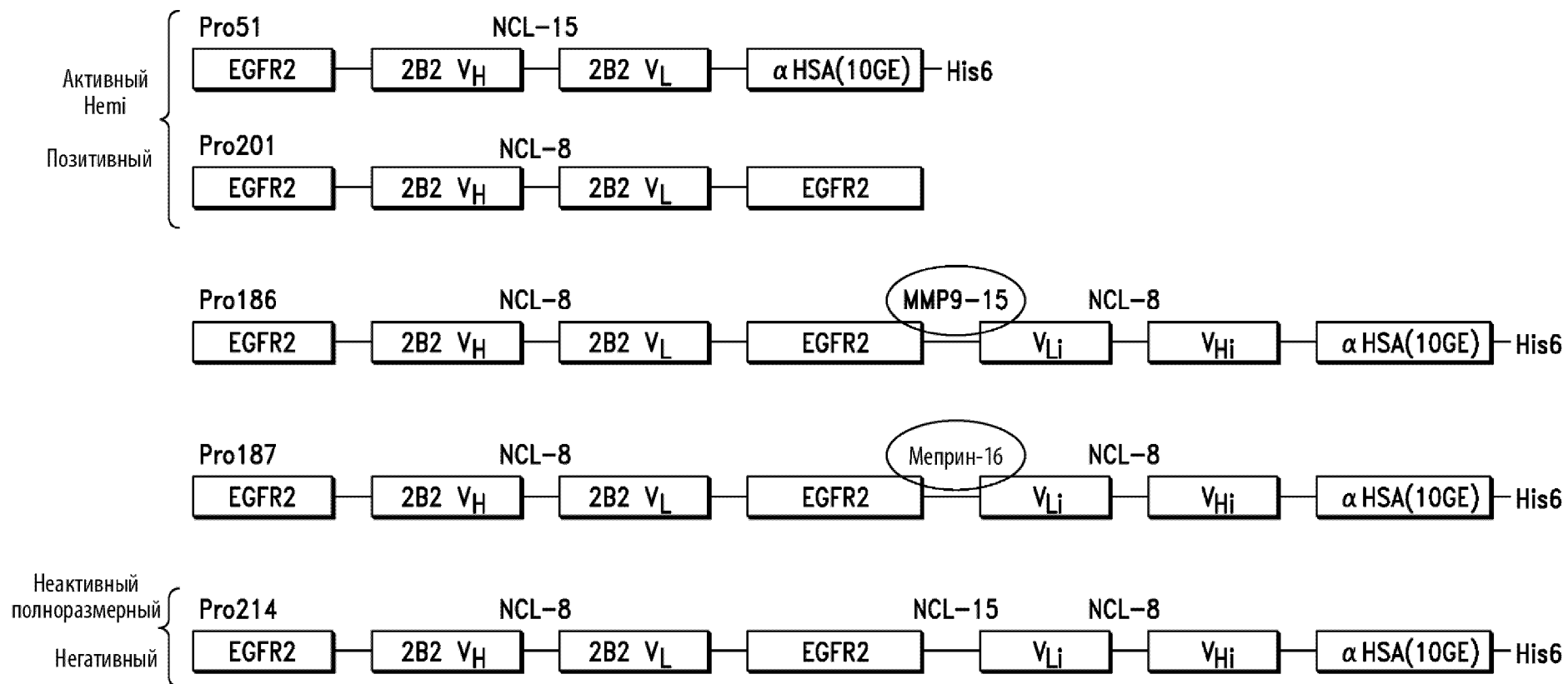
Фиг. 28В

Фиг. 29

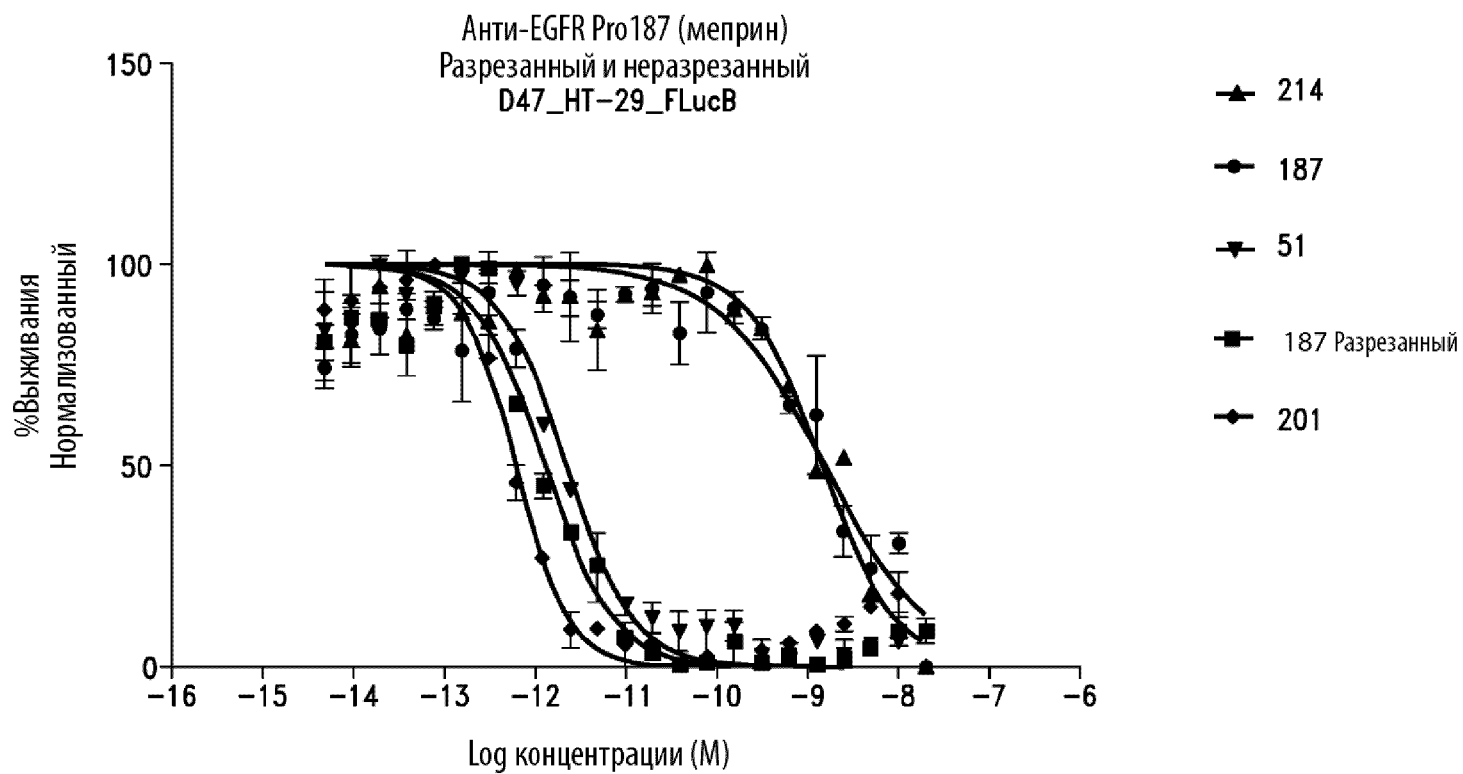


\*16мер MMP9 линкер разрезается быстрее чем 8мер MMP9 линкер

Фиг. 30

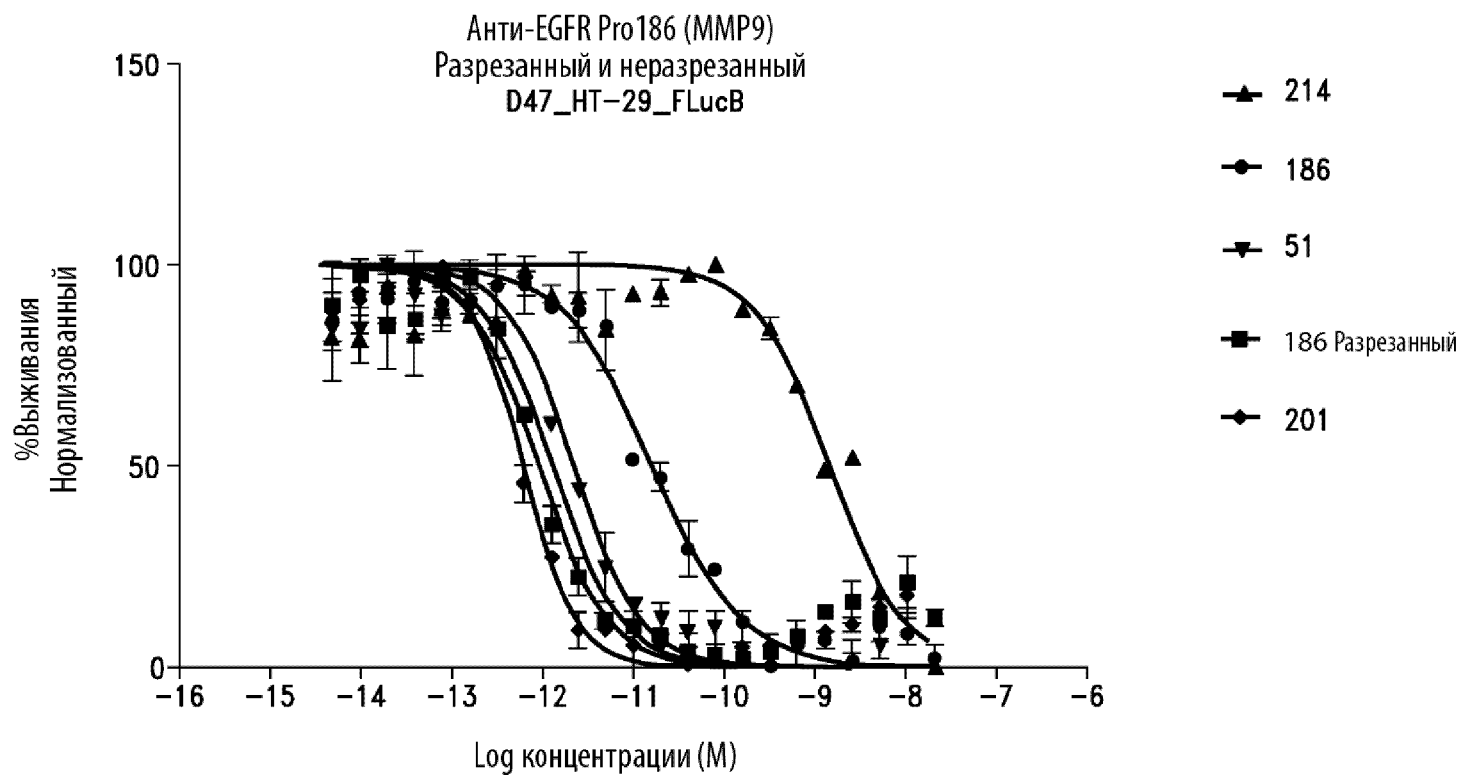


Фиг. 31



Конструкция	EC50(pM)	
187	1508.00	} 1200x
187 Разрезанный	1.26	
214	1454.00	} 4x
51	2.23	
201	0.60	

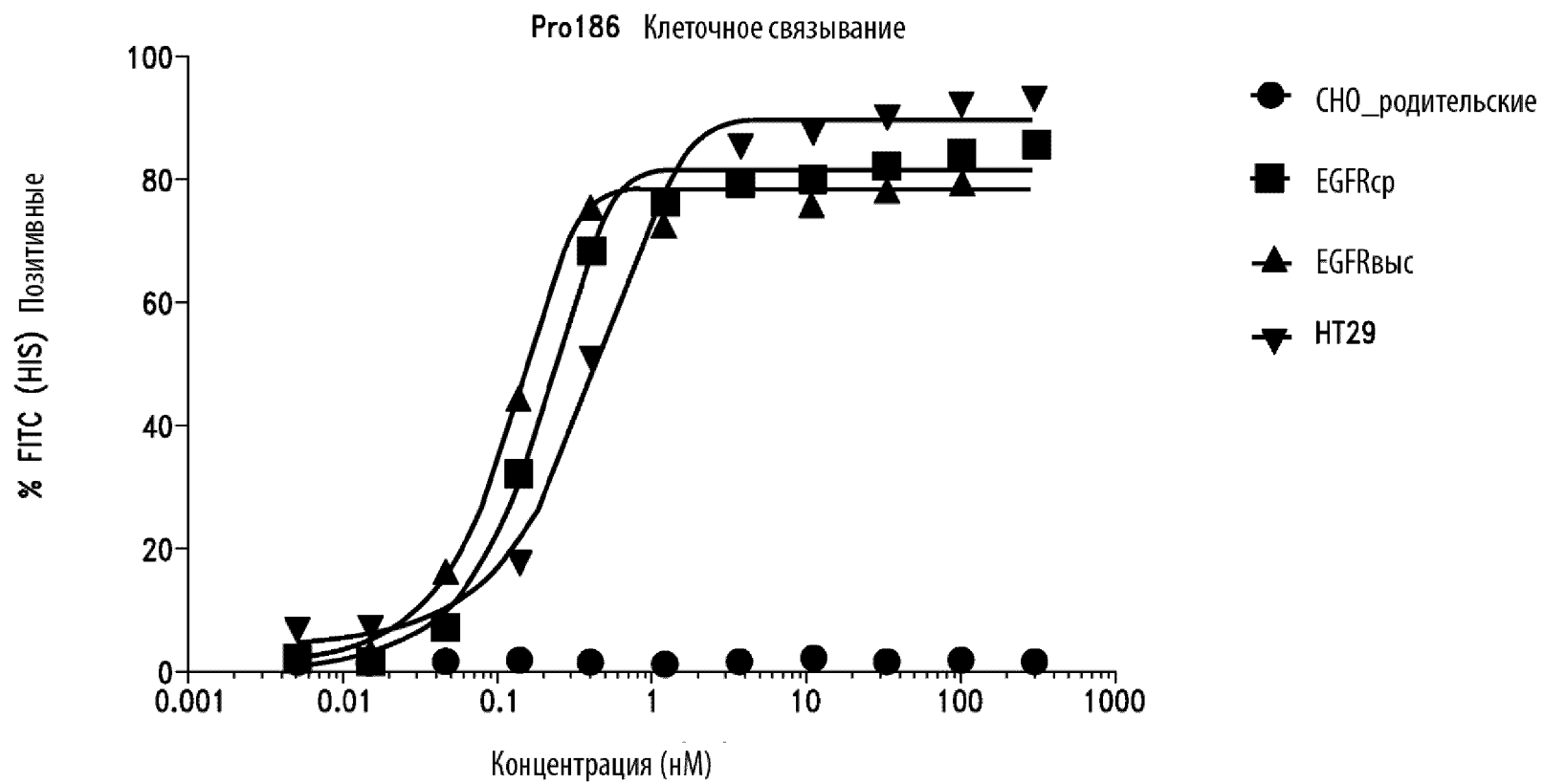
Фиг. 32



Конструкция	EC50(pM)
186	16.24
186 Разрезанный	0.90
214	1454.00
51	2.23
201	0.60

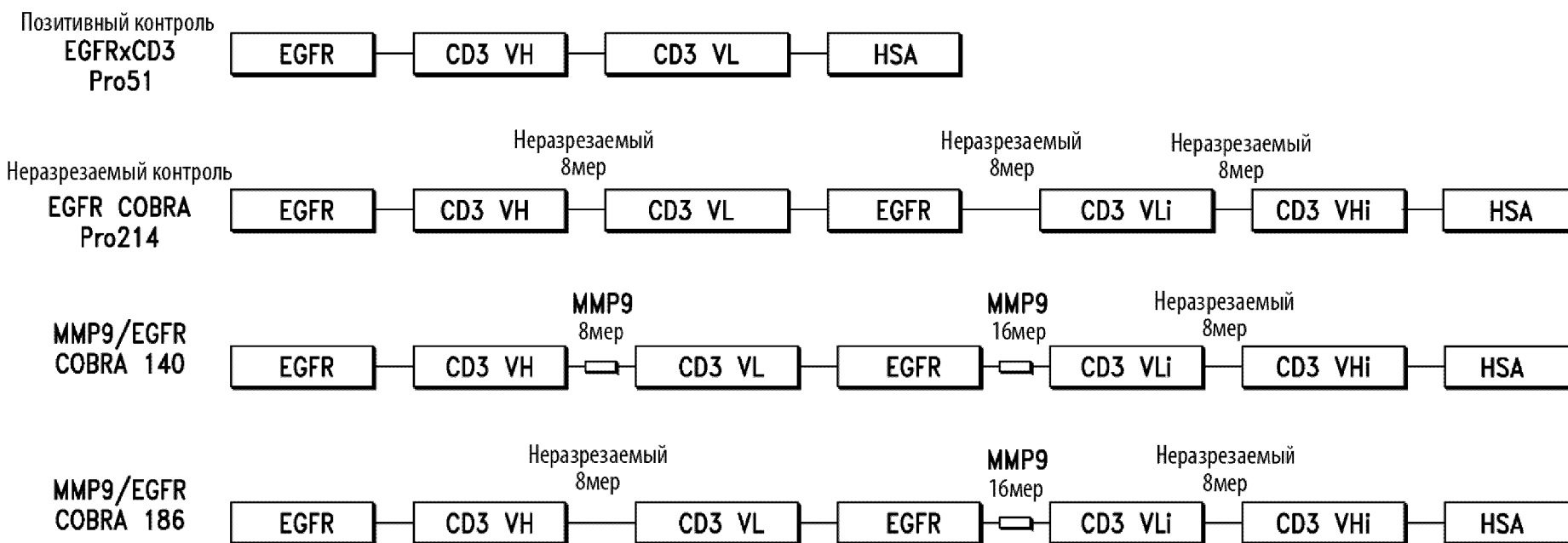
1600x { } 18x

Фиг. 33



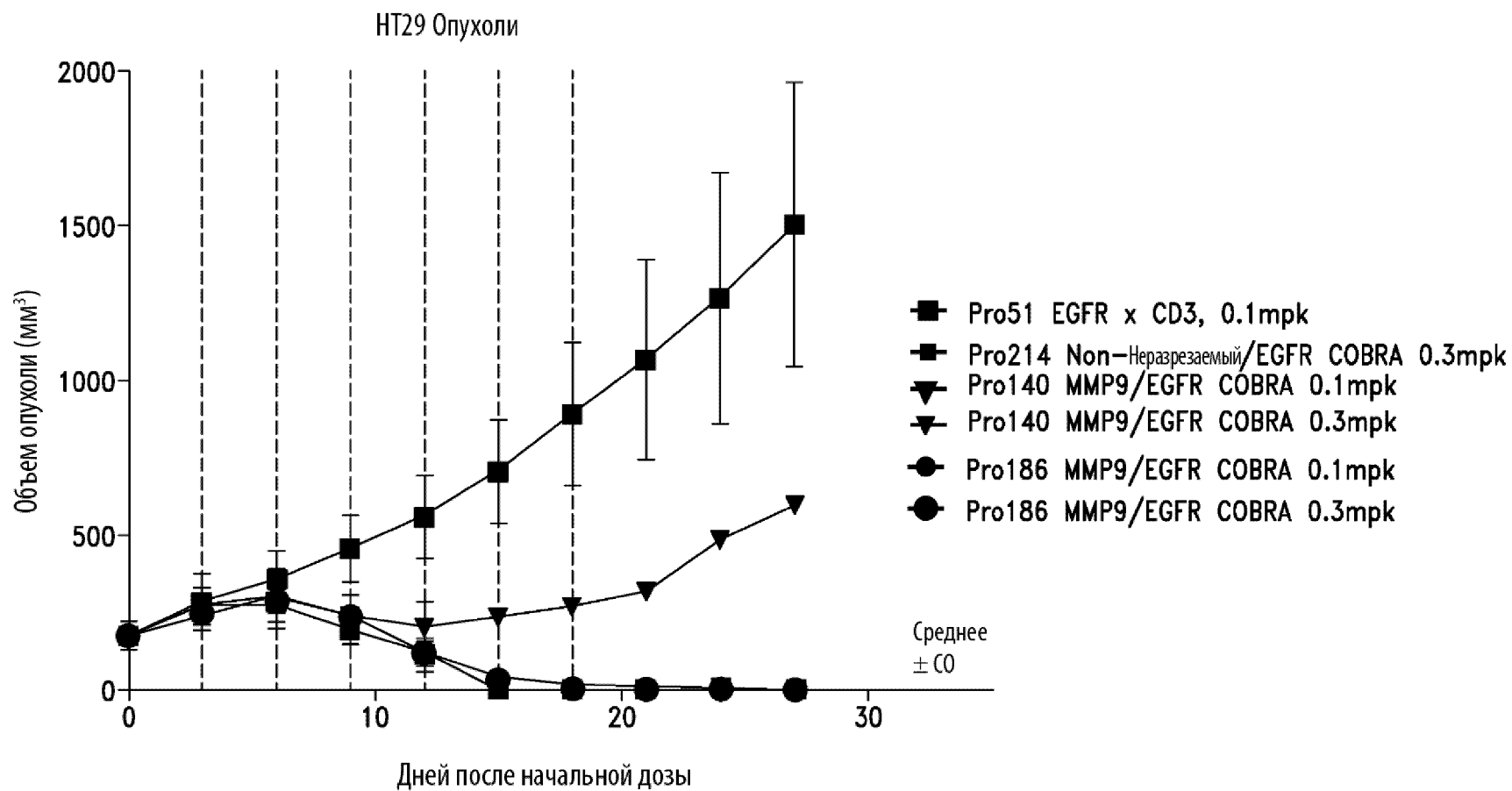
Фиг. 34

Группы:



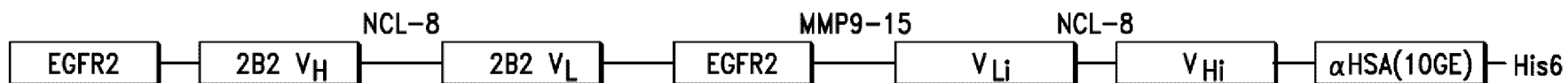


Фиг. 35



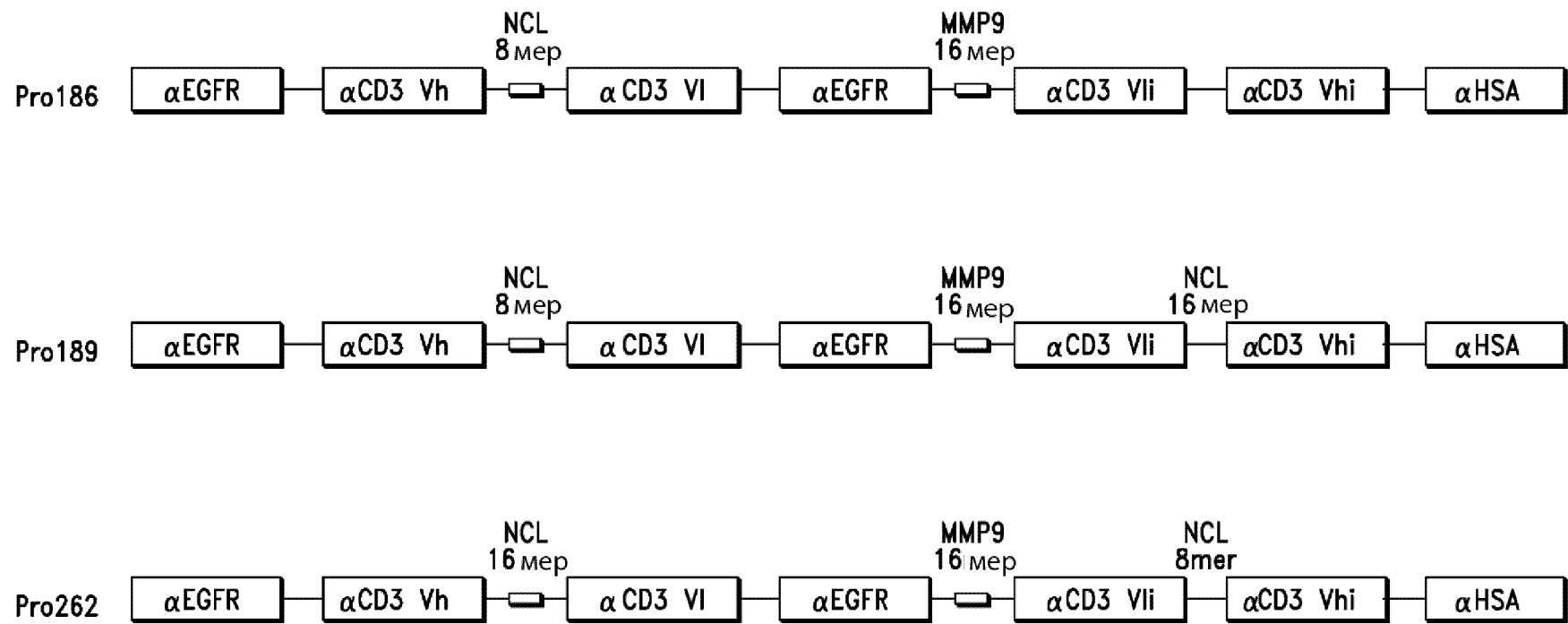
Фиг. 36

Pro186



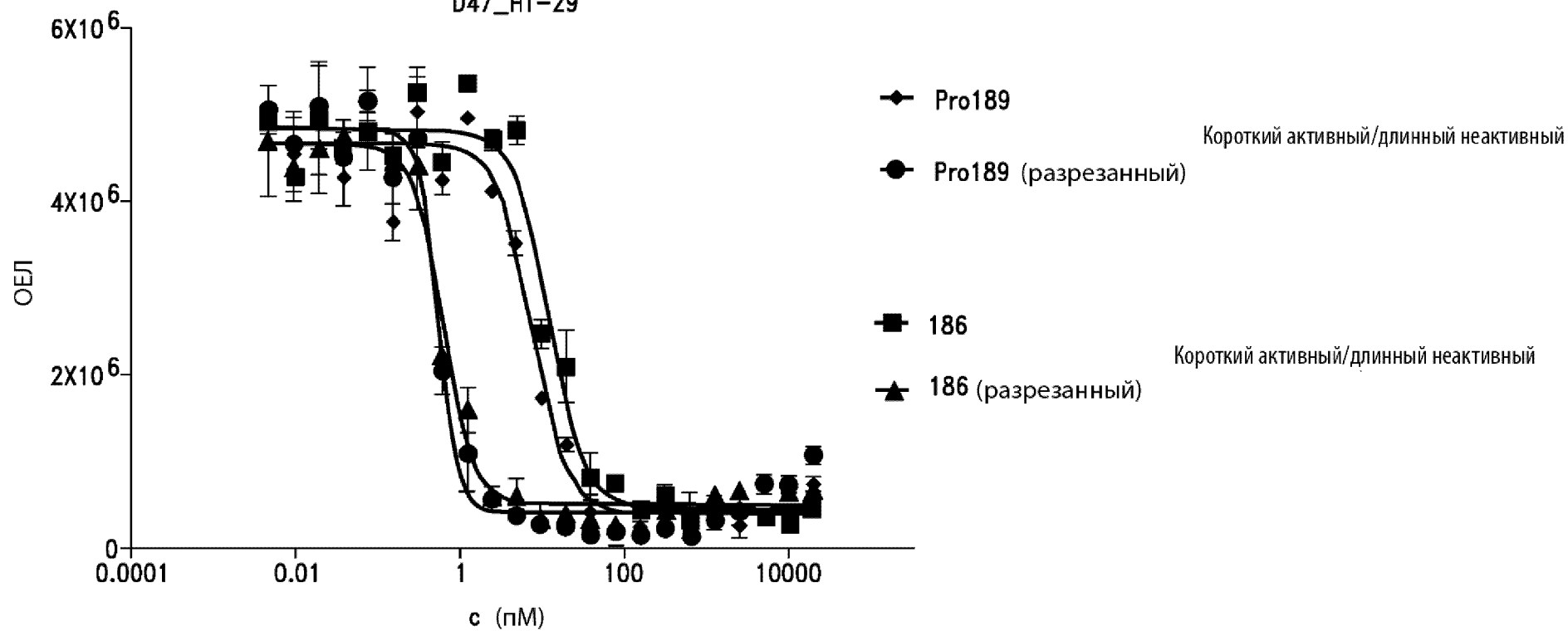
<u>Pro</u>	<u>BS1</u>		<u>DL1</u>	<u>CD3VI-</u>	<u>BS2</u>	<u>AL</u>	<u>DL2</u>	<u>CD3Vh-</u>	
393	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	S9	Vli NCL-8	Vhi	αHSA
394	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	ST14(MV)	Vli NCL-8	Vhi	αHSA
395	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	Caths	Vli NCL-8	Vhi	αHSA
396	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	MMP9v	Vli NCL-8	Vhi	αHSA
429	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	Mep/GranB	Vli NCL-8	Vhi	αHSA
430	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	MMP9-2	Vli NCL-8	Vhi	αHSA
431	EGFR2	Vh	NCL-8	VI	EGFR2	ST14(MS)	Vli NCL-8	Vhi	αHSA

Фиг. 37



Фиг. 38

Анти-EGFR Pro186 vs Pro189  
D47\_HT-29

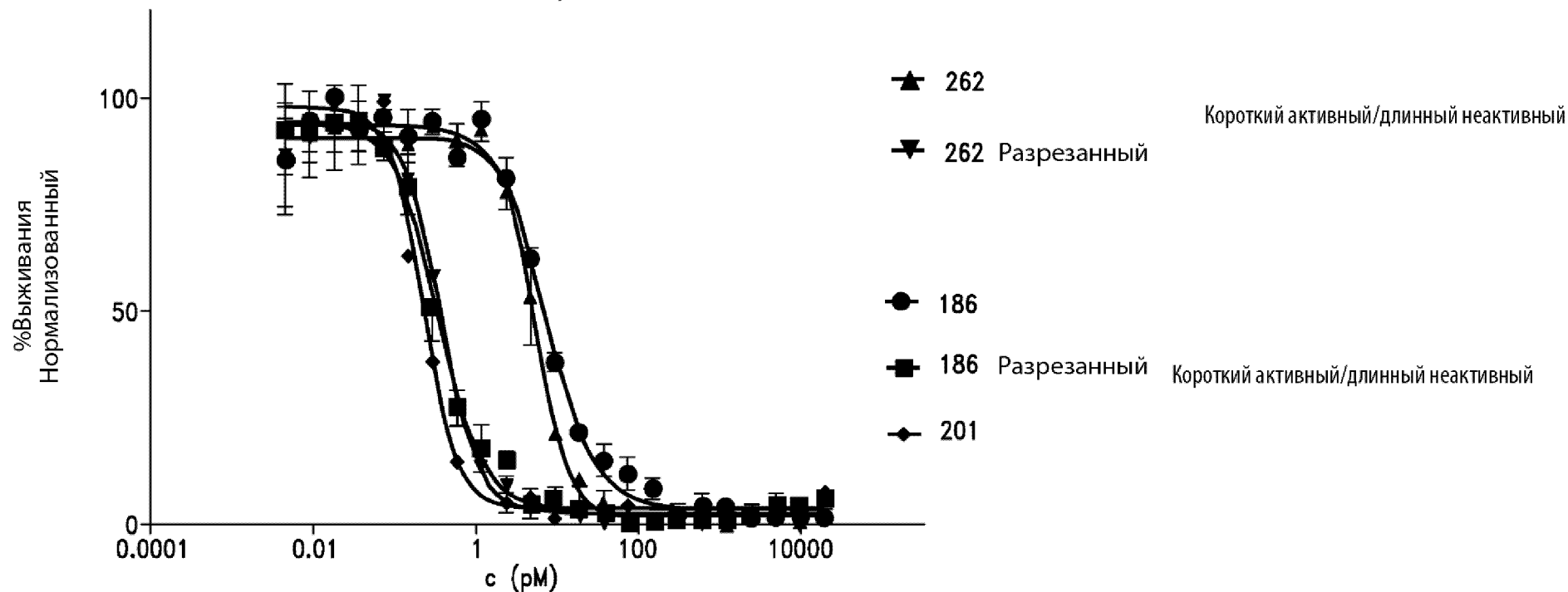


57/105

	EC50
Pro189	7.754
Pro189 (разрезанный)	0.5528
186	12.41
186 (разрезанный)	0.6232

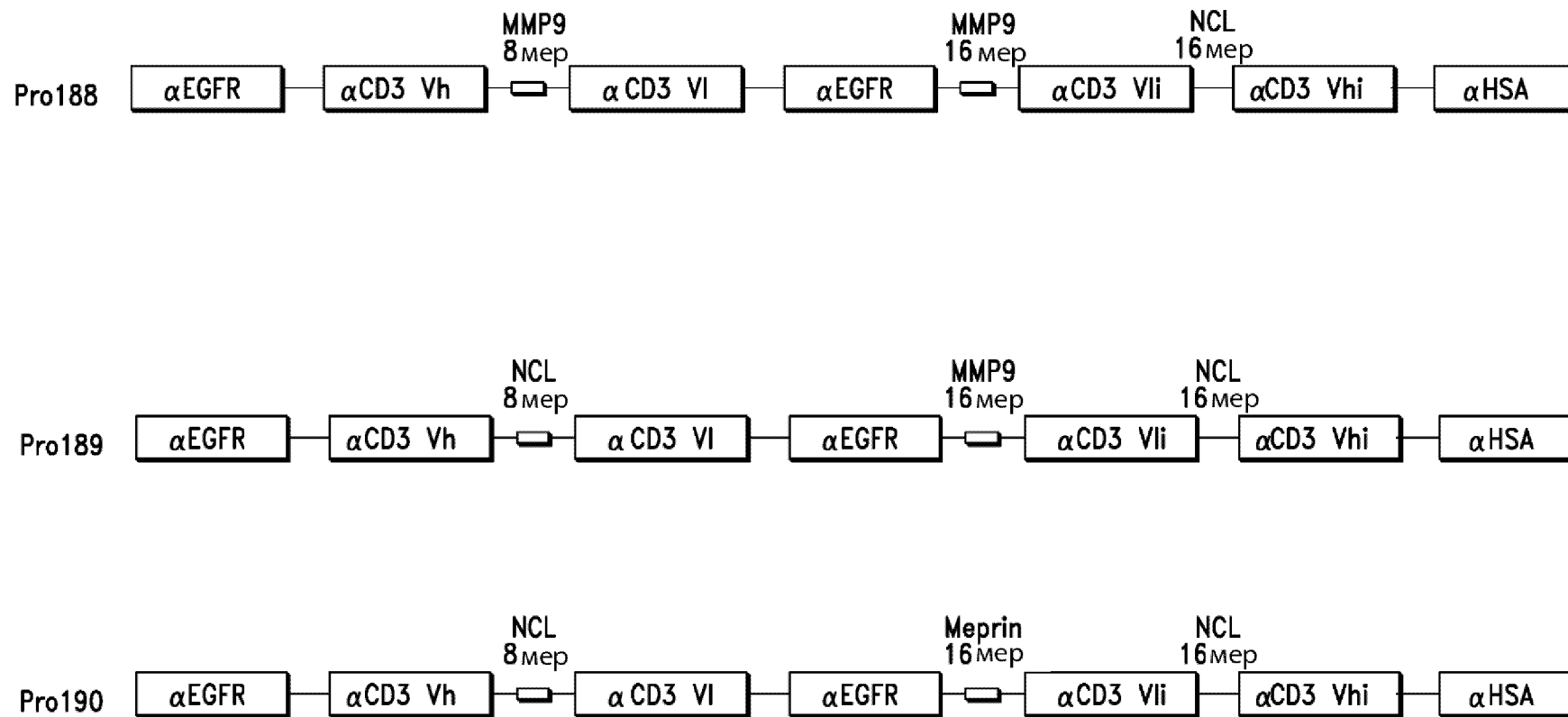
Фиг. 39

Pro186 vs Pro262  
D92\_HT-29)FLucB

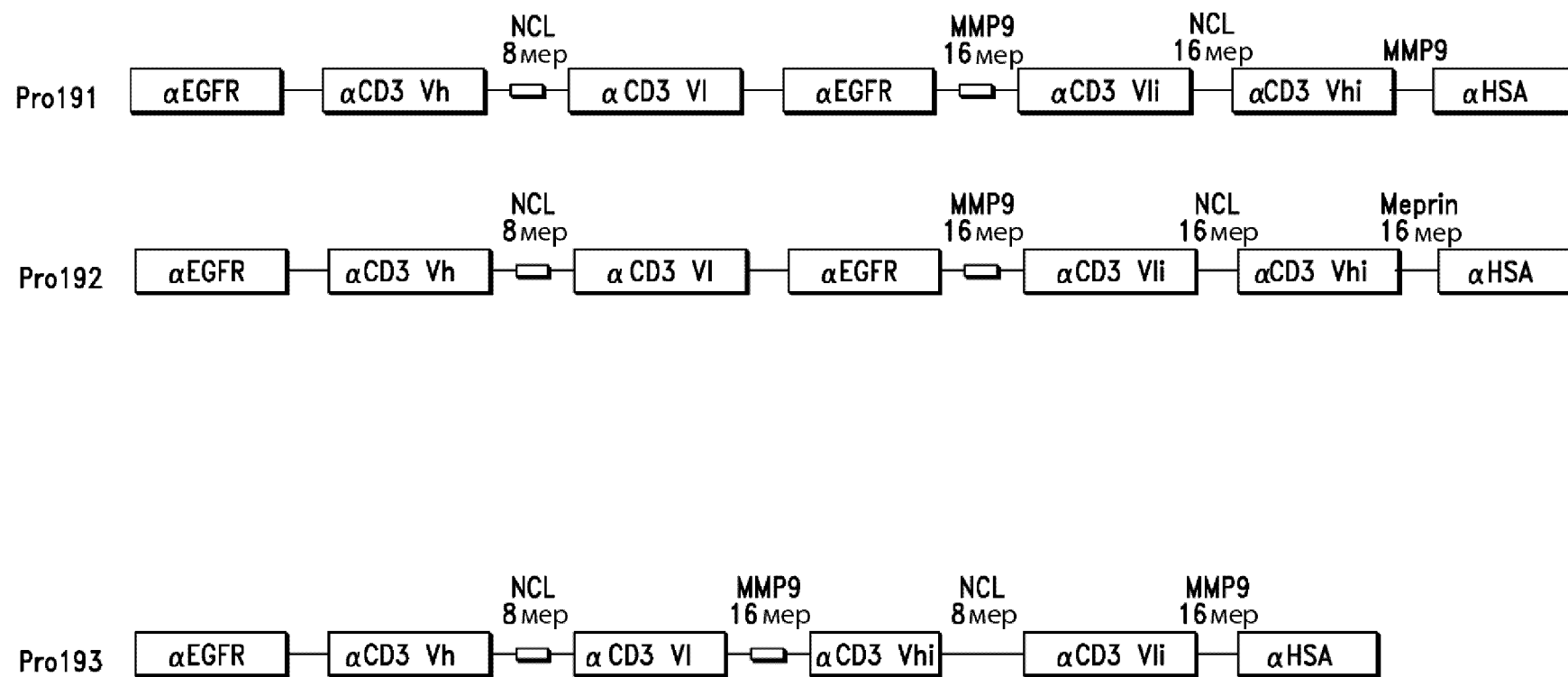


	EC50
262	5.69
262 Разрезанный	0.3968
201	0.238
186	7.716
186 Разрезанный	0.3521

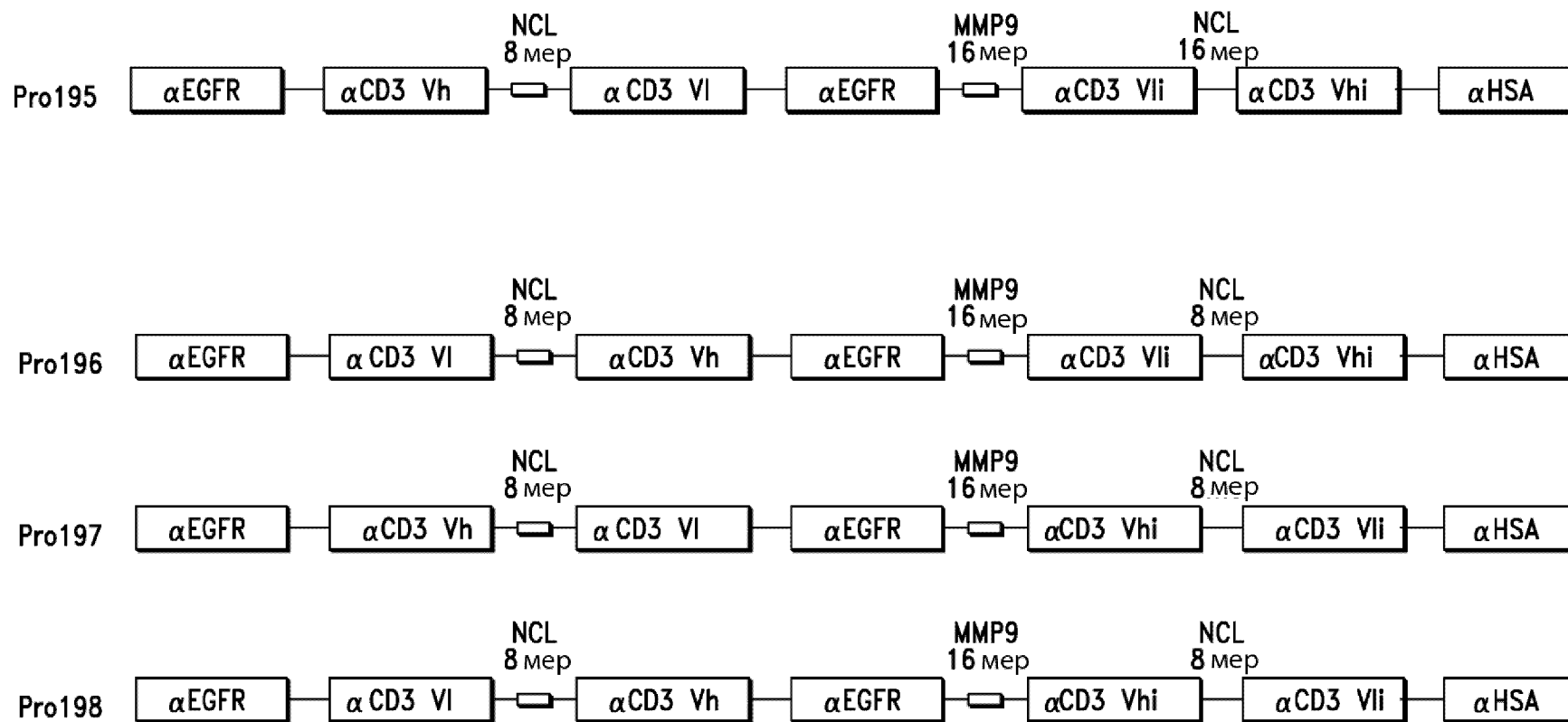
Фиг. 40А



Фиг. 40В



Фиг. 40С

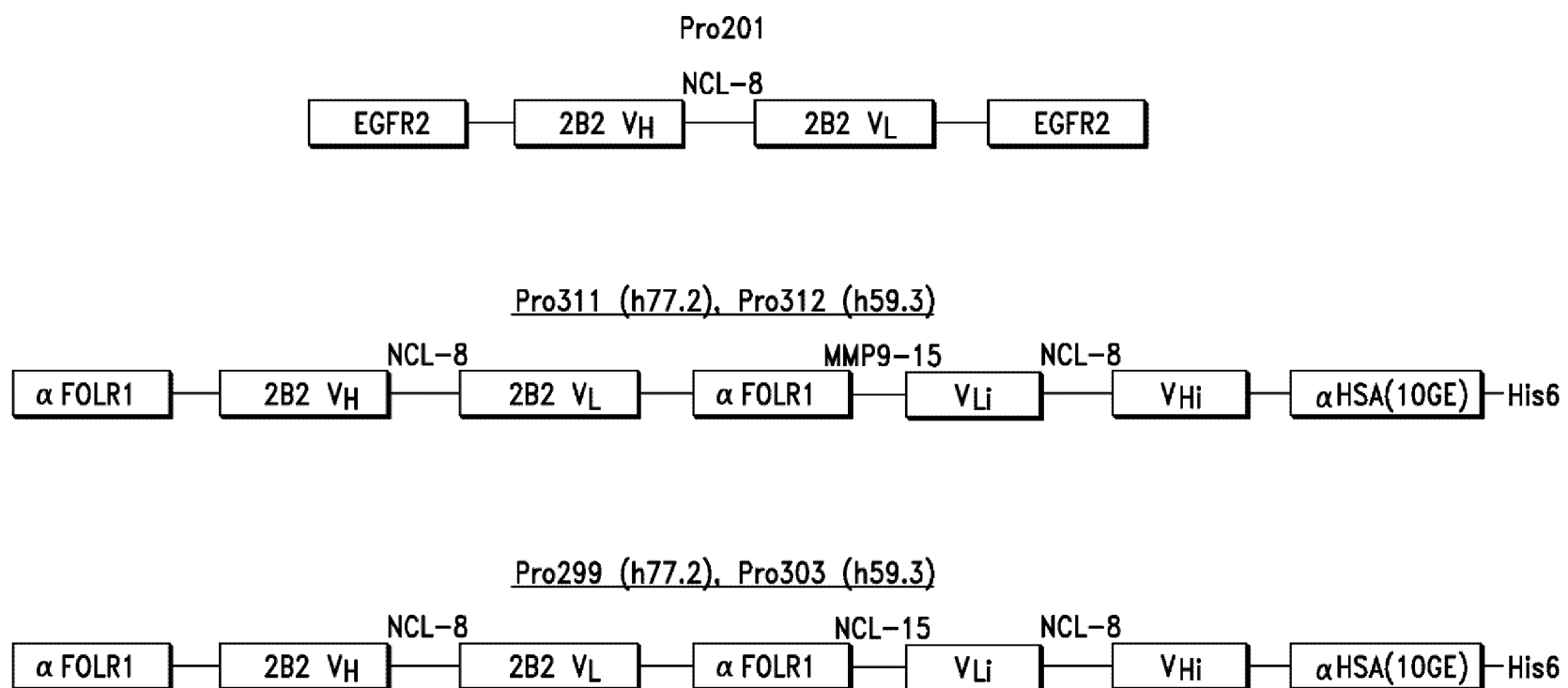




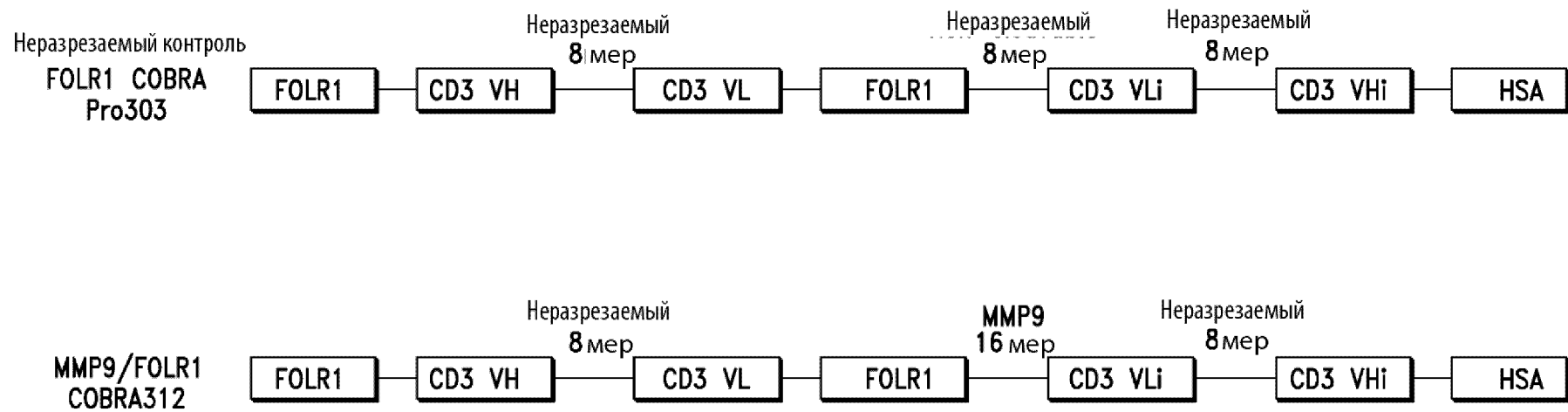
Фиг. 41

одАт		Связывание белка: $K_D$ (нМ)			Клеточное связывание:		TDCC $EC_{50}$ (пМ)	
MVK ID	Семейство	Человек	Резус	Мышь	Человек	Резус	IGROV1	OVAR8
77-2	2	2	3	7	+++	+++	2	0.2
59-3	3	15	53	NB	+++	+++	30	6
22-4	4	2	11	NB	+++	+++	8	1
Pro51							41	2

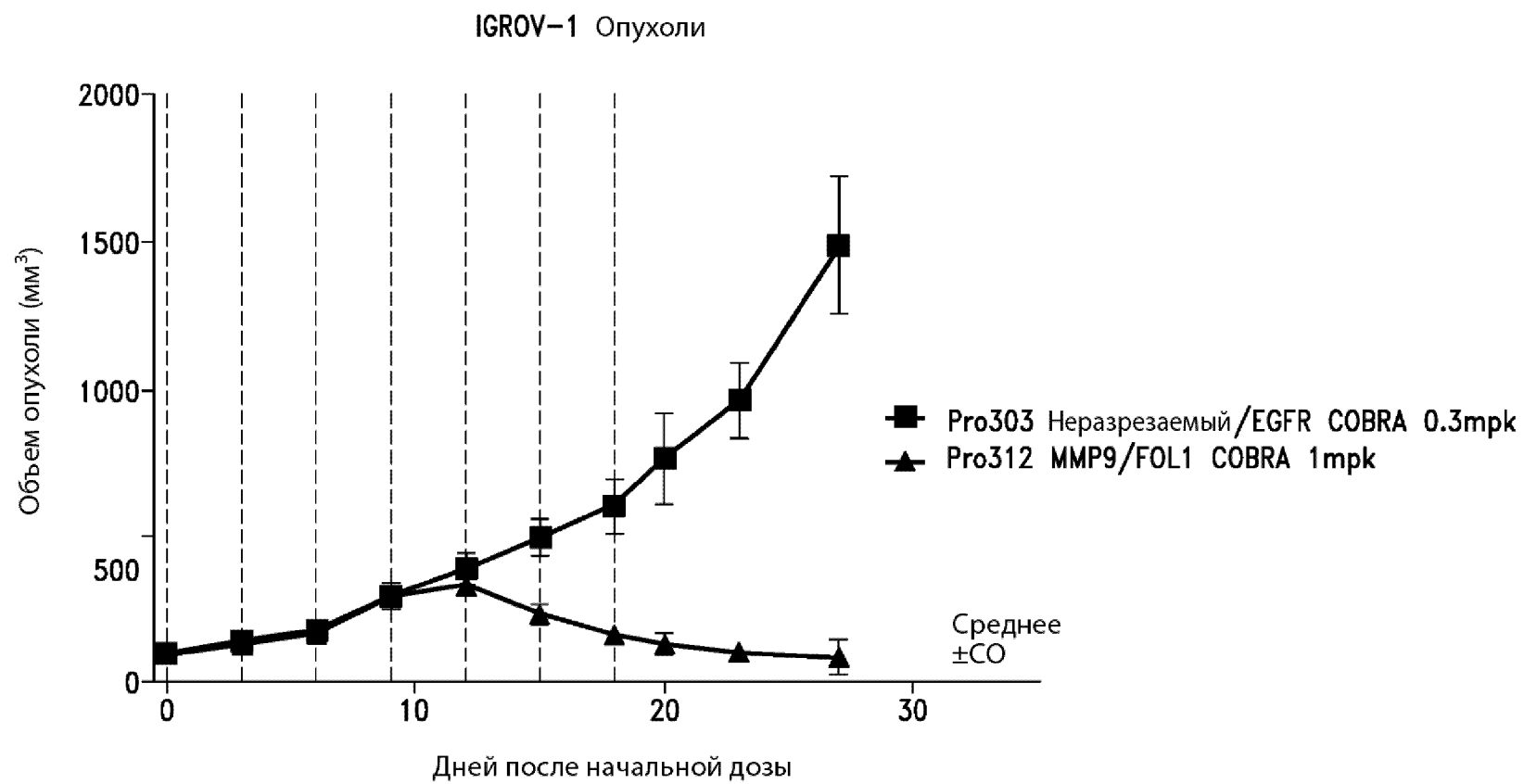
Фиг. 42



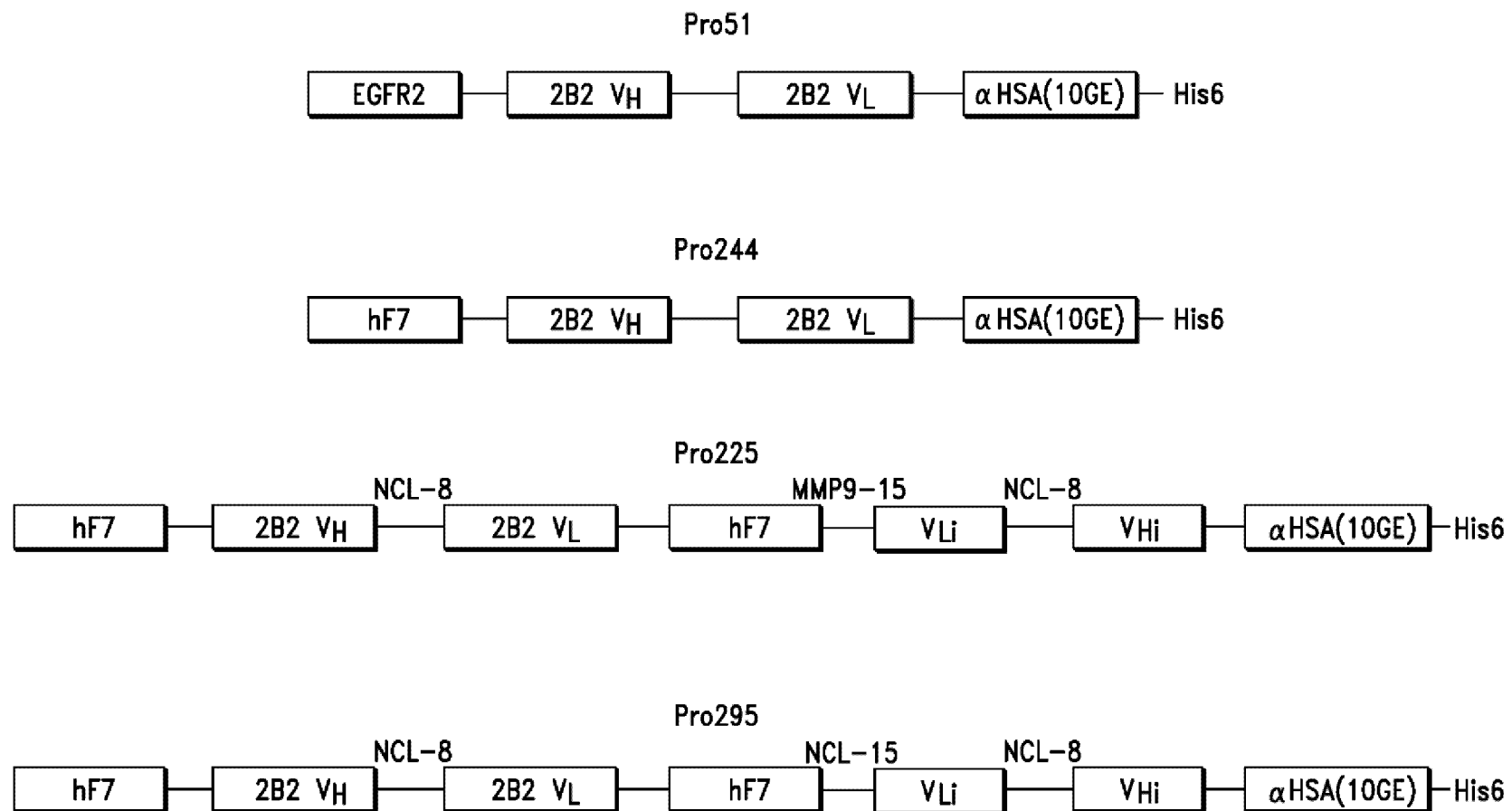
Фиг. 43



Фиг. 44

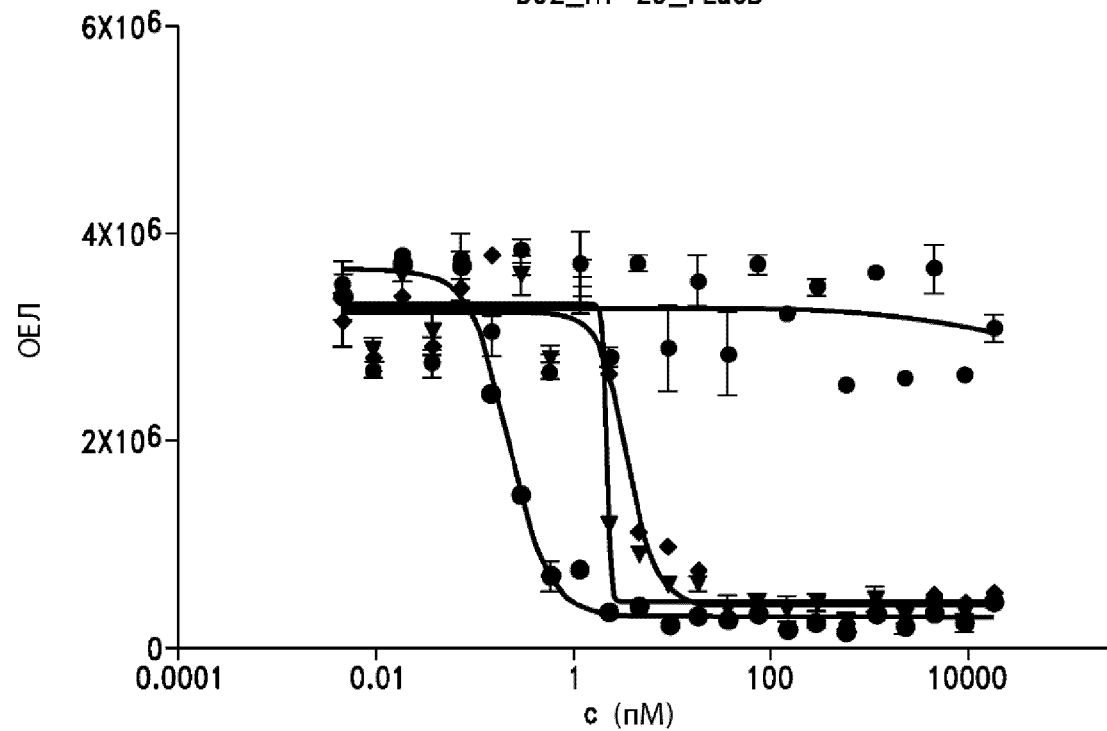


Фиг. 45



Фиг. 46

Анти-B7H3 hF7 полноразмерный  
D92\_HT-29\_FLucB



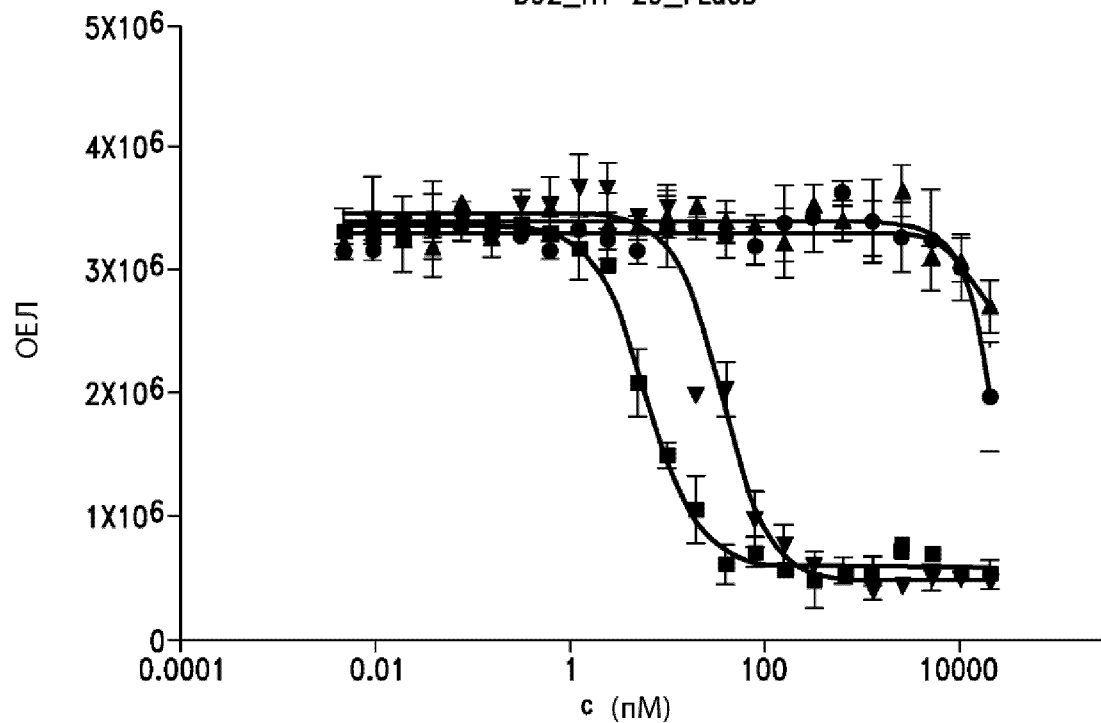
- 295 FL hF7/NCL
- ▼ 225 FL hF7/MMP9
- ◆ 225 FL hF7/MMP( разрезанный)
- 201 PC EGFR (2TD)

	EC50
225	~2.313
225 Разрезанный	3.757
295	8497
201	0.2374

} 2000x

Фиг. 47

Анти-В7Н3 hF7 полноразмерный  
D92\_HT-29\_FLucB

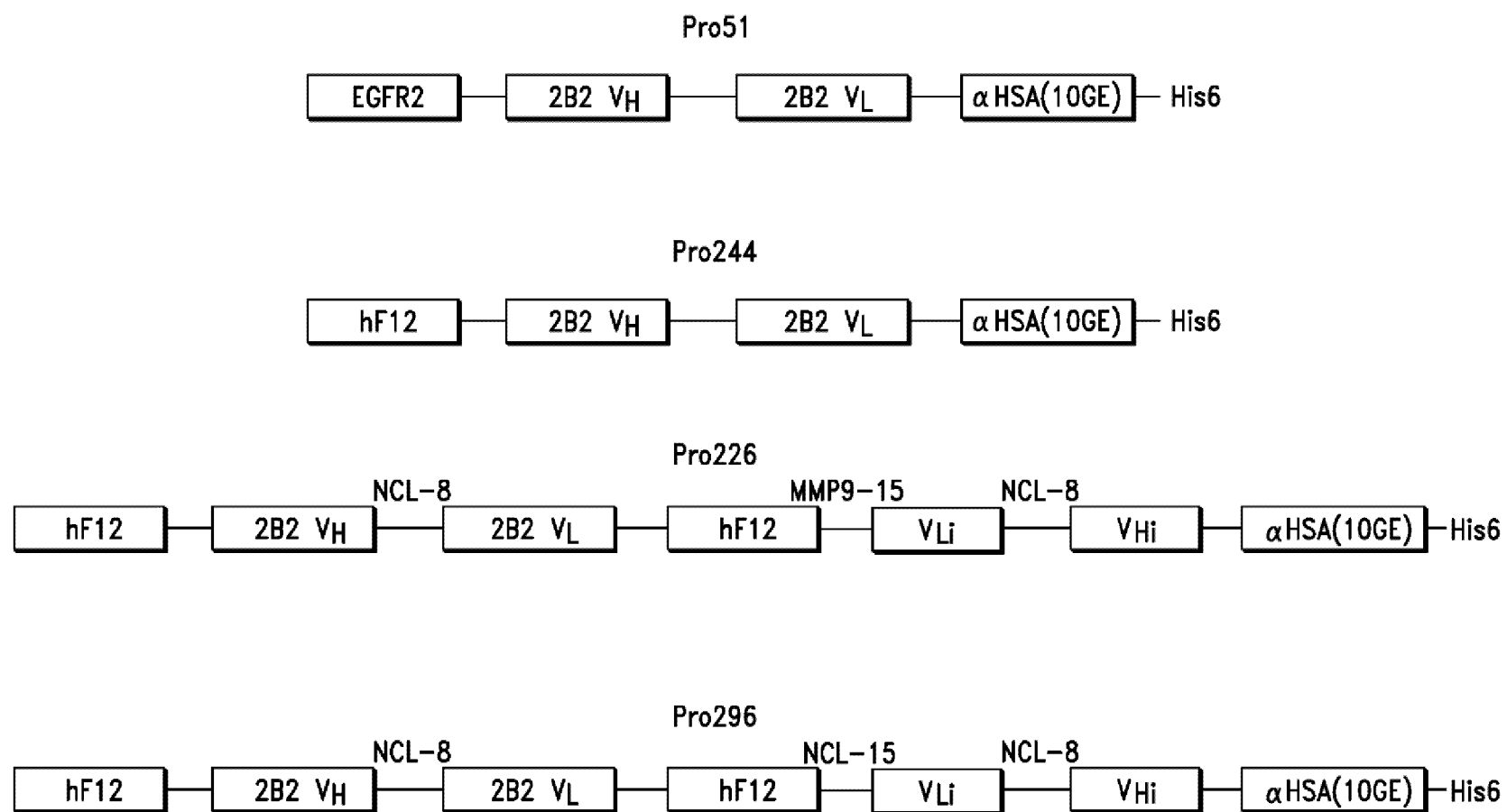


- ▲ 295 FL hF7/NCL
- 373 FL hF7/Меприн
- ▼ 244 PC hF7 (1TD)
- 373 FL hF7/Меприн разрезанный

	EC50
373	~29872
373 Разрезанный	6.038
295	13371
244	35.63

} 5000x

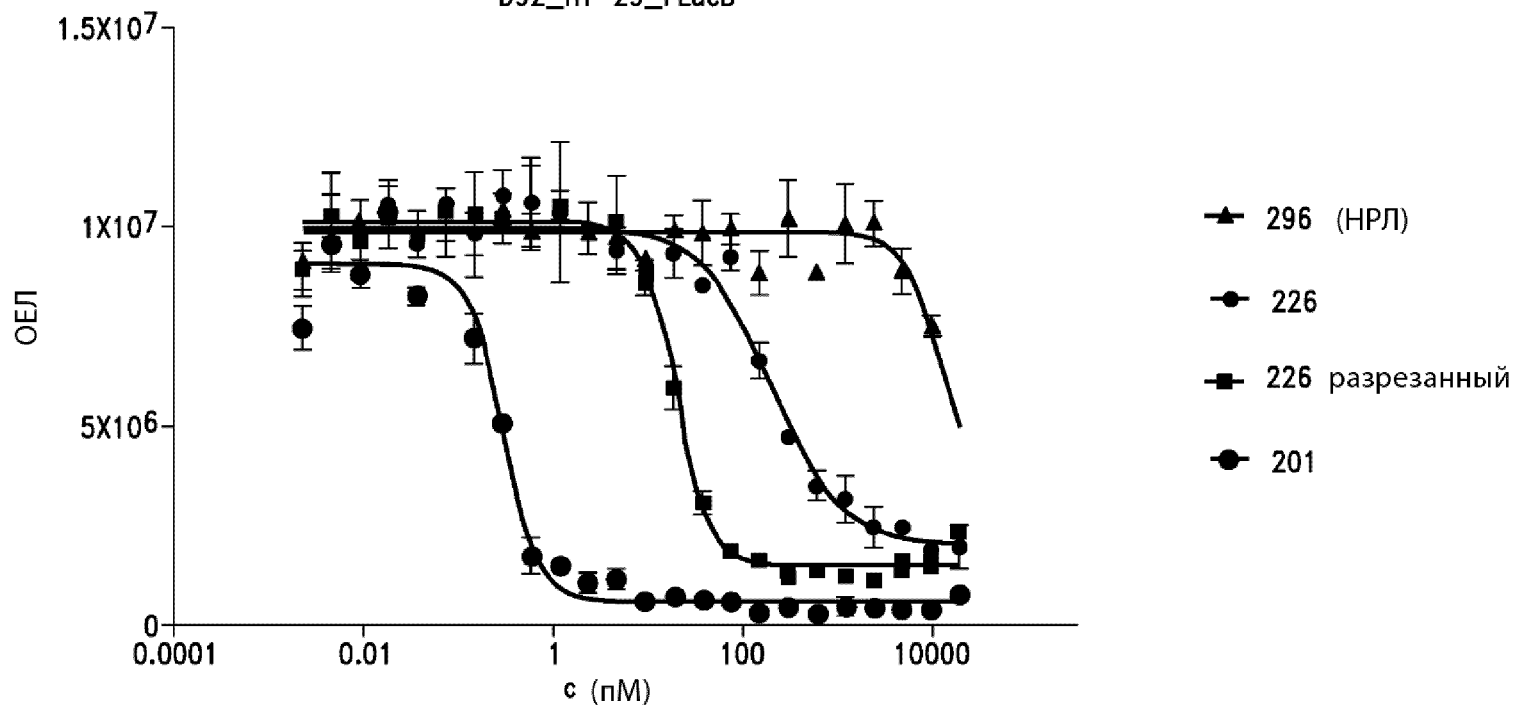
Фиг. 48





Фиг. 49

Анти-B7H3 hF7 полноразмерный  
D92\_HT-29\_FLucB



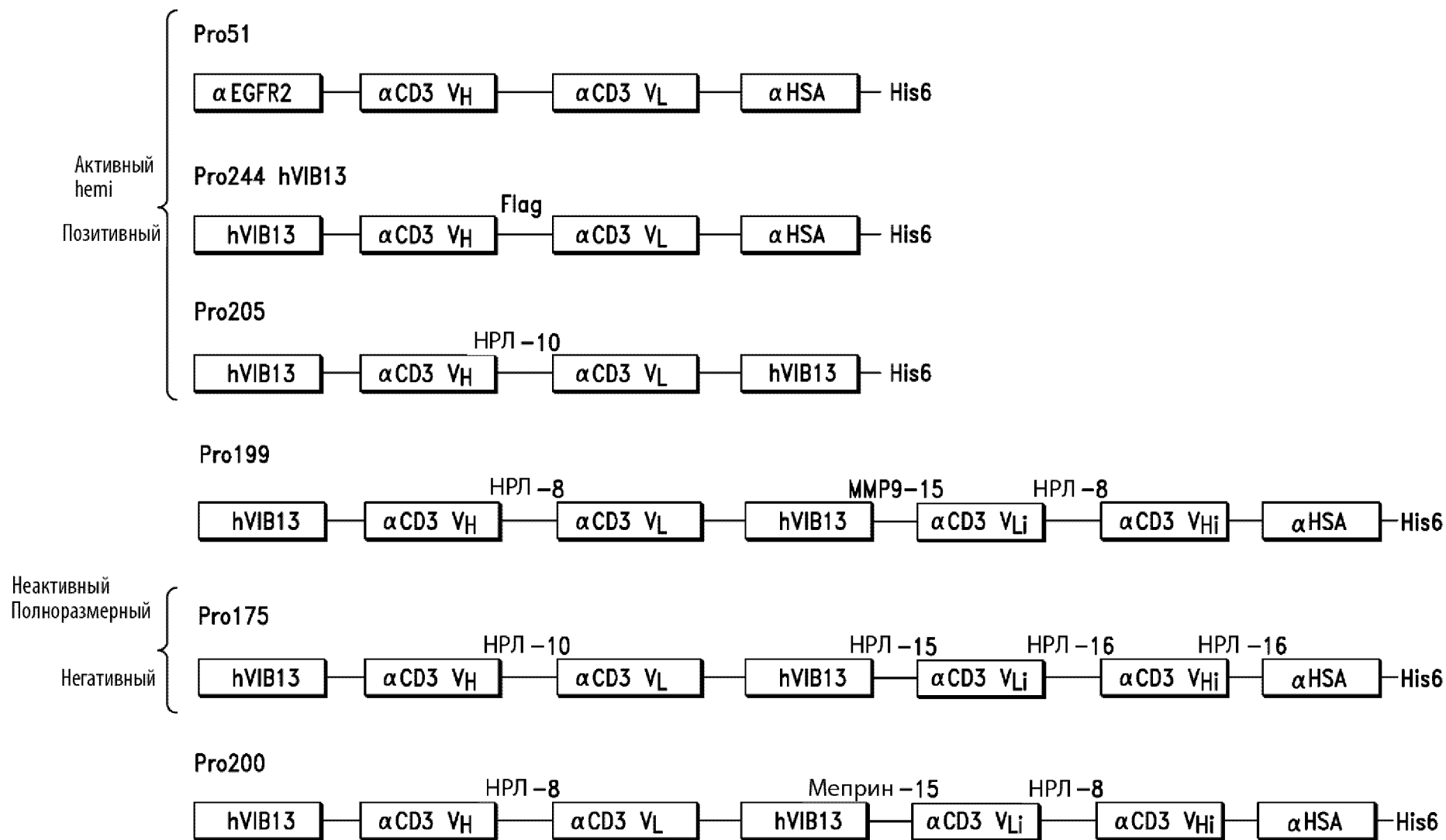
	EC50
226	211.7
226 разрезанный	20.3
296 (НРЛ)	13075
201	0.3082

Фиг. 50

Афинность связывания (нМ)      Перекрестная реактивность

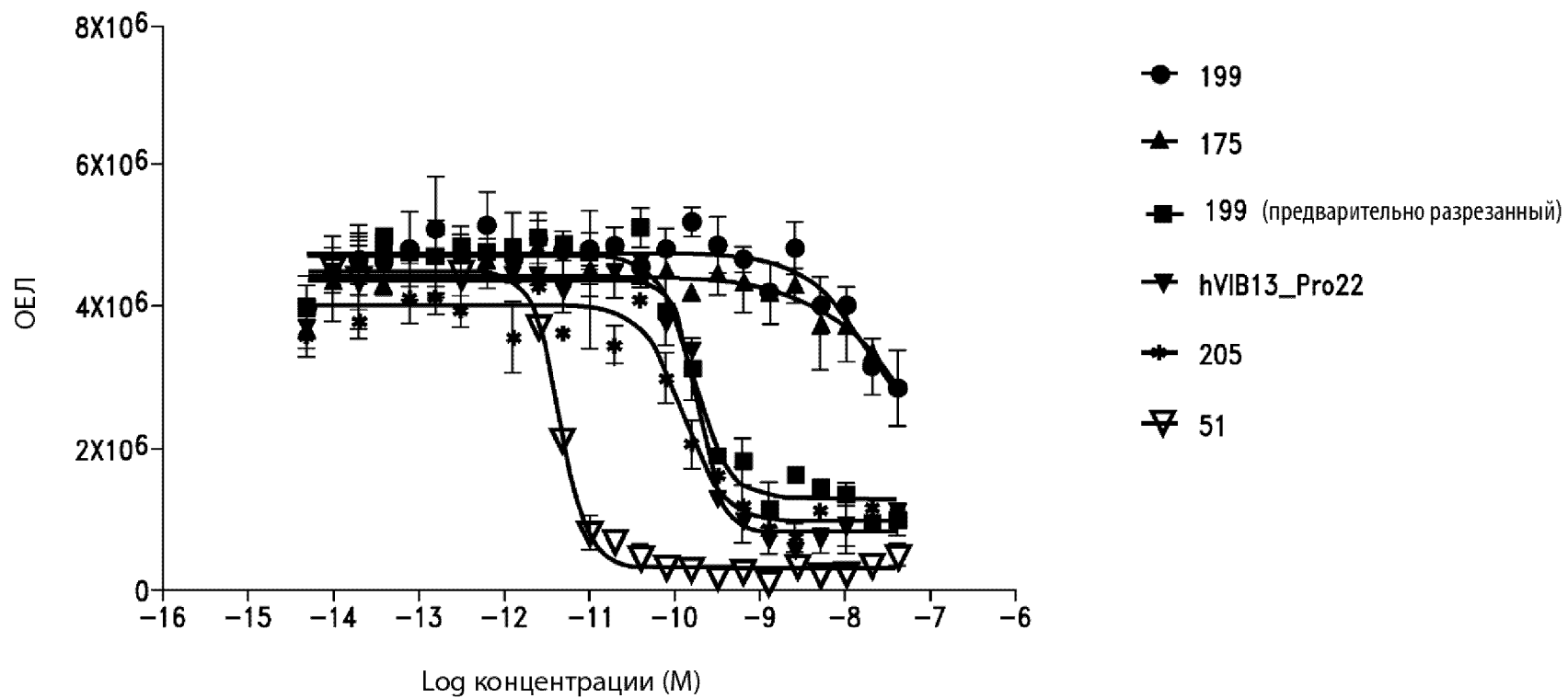
<u>Клон</u>	<u>Человек</u>	<u>Яванский макак</u>	<u>Яванский макак/ Человек</u>
VIB-13	2.3	11.6	5
hVIB-13	2.8	12.7	4.5
VIB-23	4.2	46.7	11.1
hVIB-23	4.1	51.8	12.6

Фиг. 51



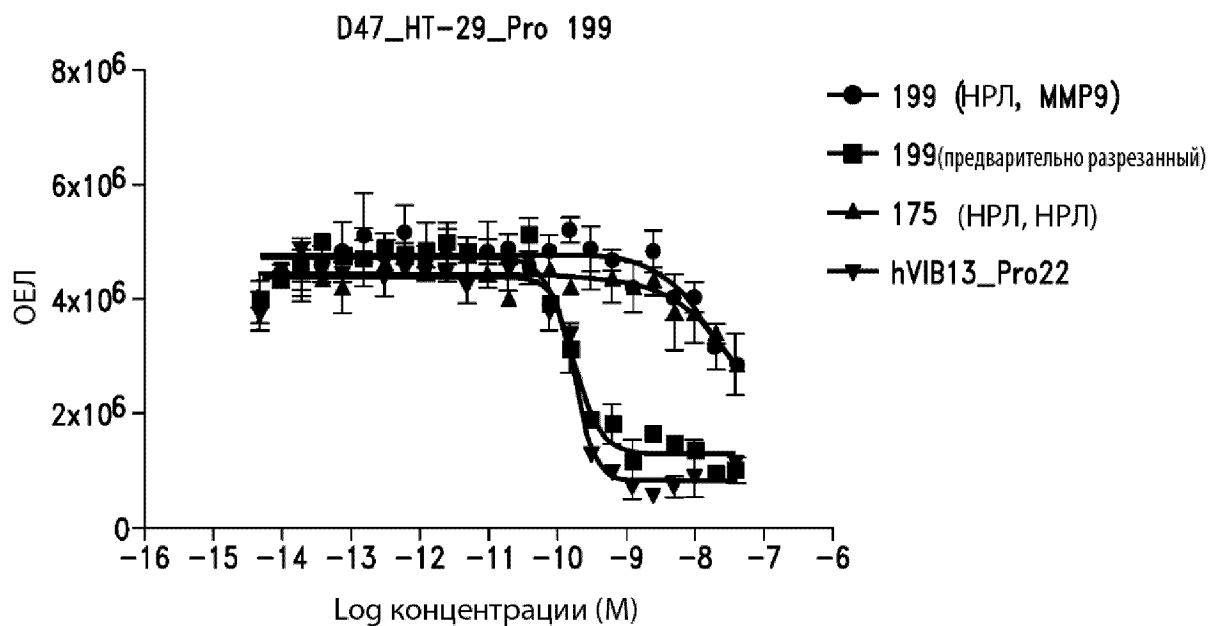
Фиг. 52

D47\_HT-29\_Pro199



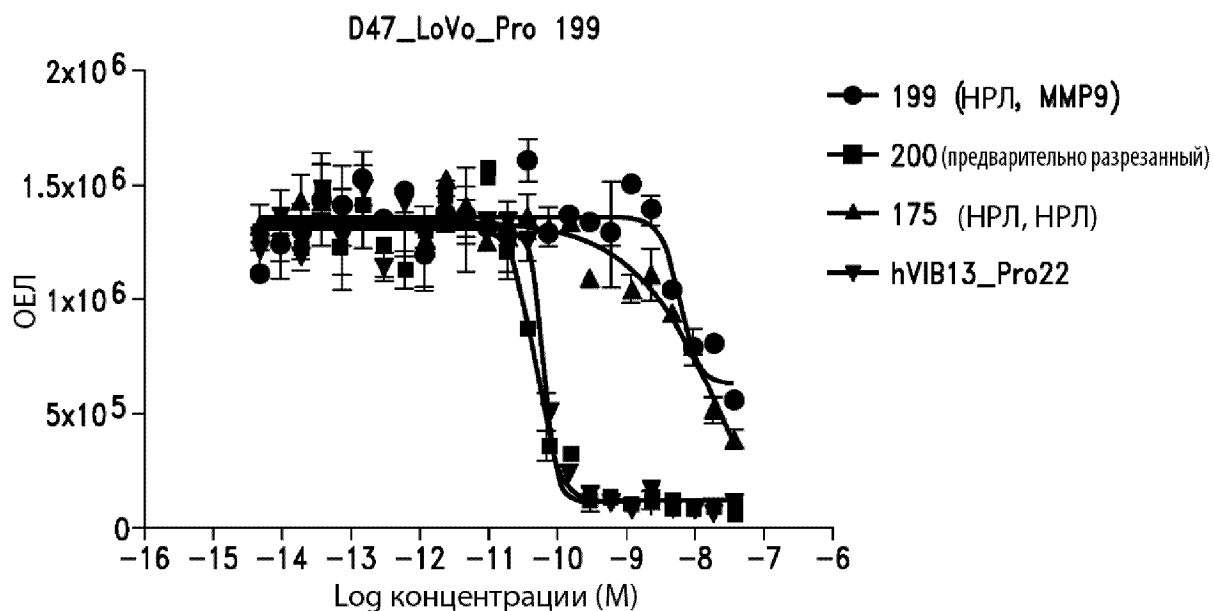
Конструкция	EC50 (пМ)	
199		} >100x
199разрезанный	164.60	
175		
hVIB13_Pro22	184.40	40x ↓ {
51	4.54	
205	123.2	

74/105



	EC50
199 (НРЛ, MMP9)	1.657e-008
199 (предварительно разрезанный)	1.646e-010
175 (НРЛ, НРЛ)	7.461e-008
hVIB13_Pro22	1.844e-010

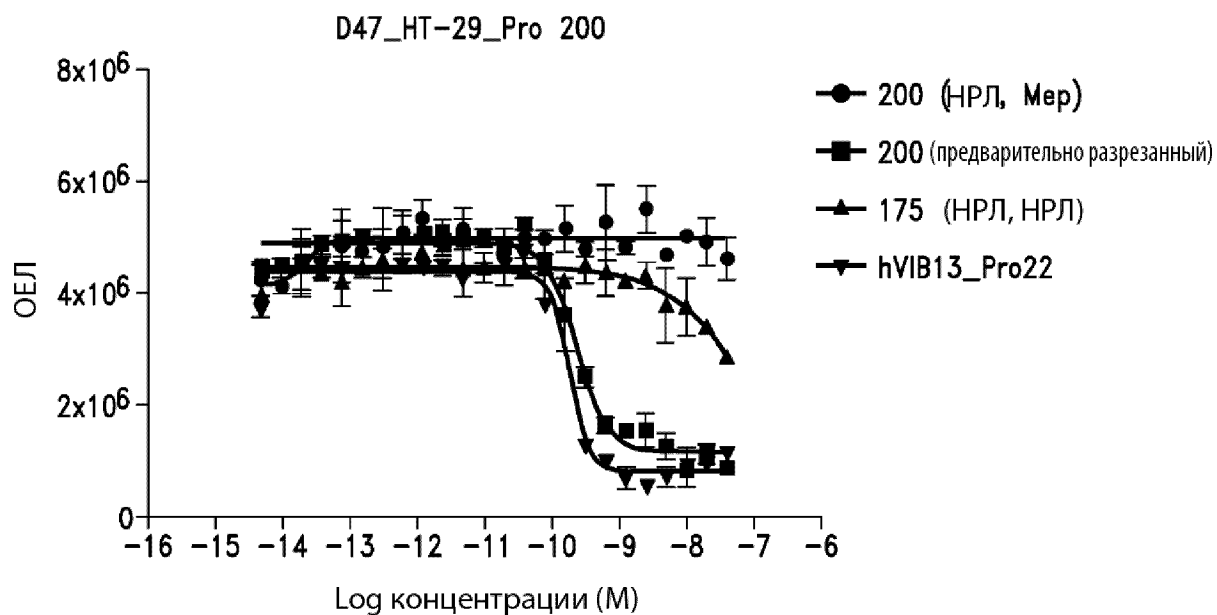
Фиг. 53А



	EC50
199 (НРЛ, MMP9)	6.344e-009
199 (предварительно разрезанный)	4.912e-011
175 (НРЛ, НРЛ)	3.882e-008
hVIB13_Pro22	6.75e-011

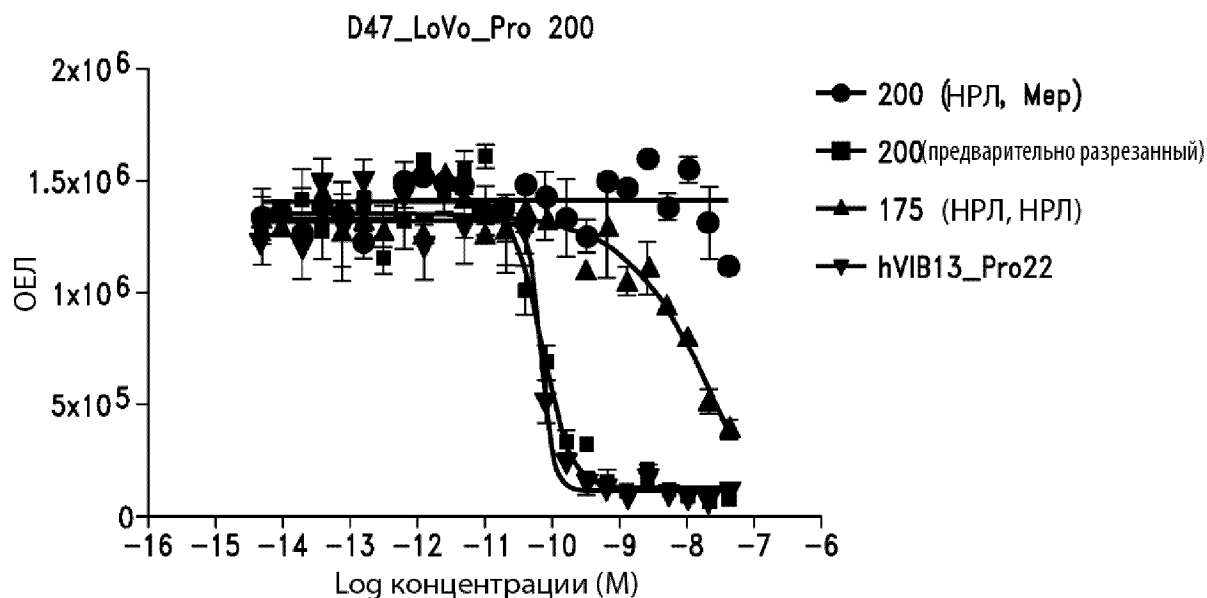
Фиг. 53В

# 75/105



	EC50
200 (НРЛ, Мер)	2.256e-014
200 (предварительно разрезанный)	2.343e-010
175 (НРЛ, НРЛ)	7.461e-008
hVIB13_Pro22	1.844e-010

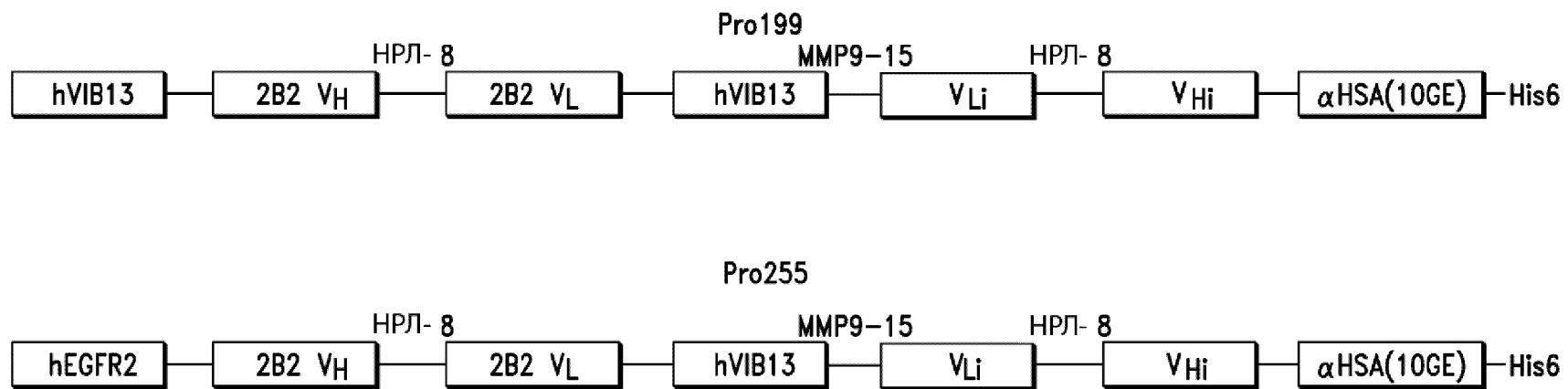
Фиг. 54А



	EC50
200 (НРЛ, ММР9)	~4.648e-013
200 (предварительно разрезанный)	6.76e-011
175 (НРЛ, НРЛ)	3.882e-008
hVIB13_Pro22	6.75e-011

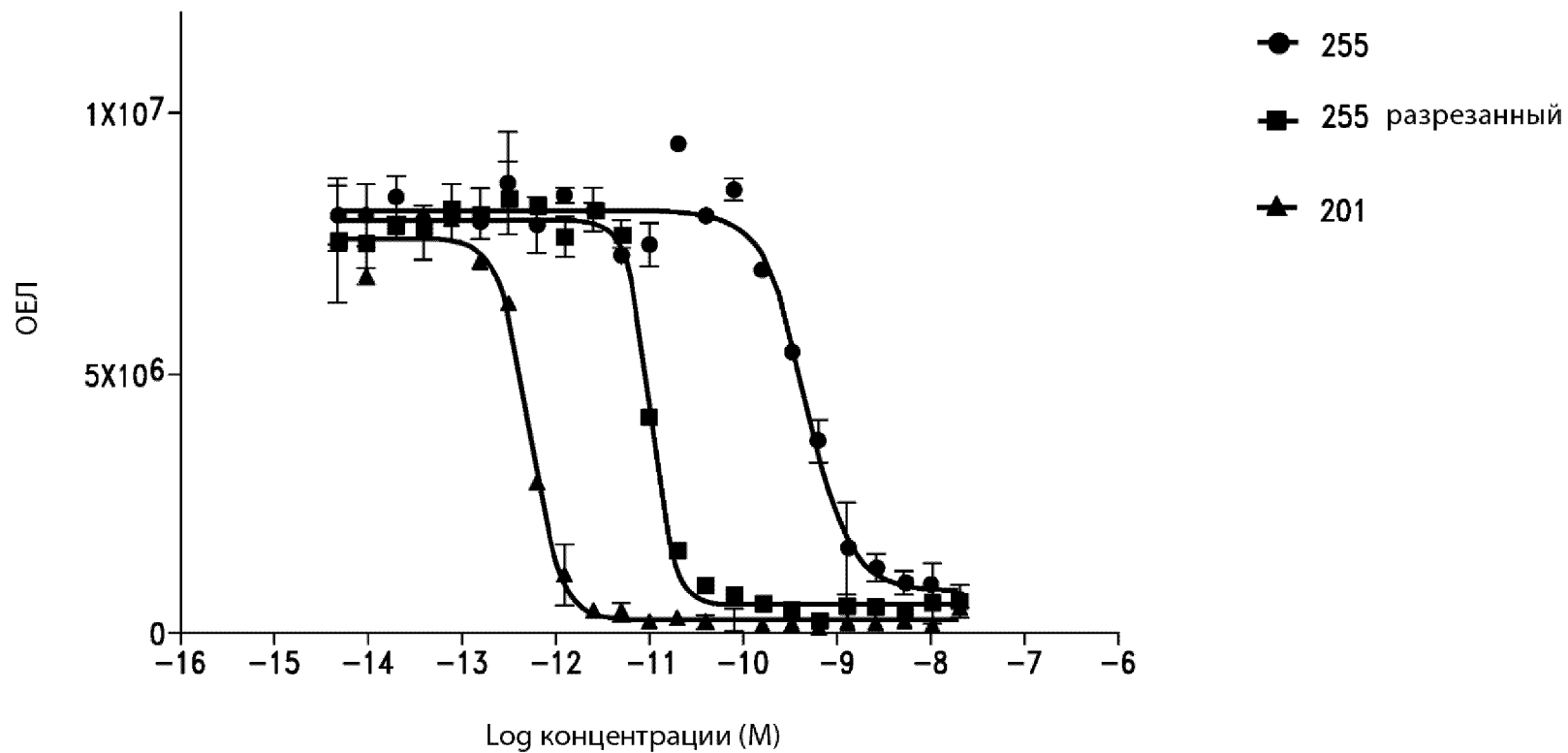
Фиг. 54В

Фиг. 55



Фиг. 56

Анти-EGFR и анти-EpCAM гетерологичный полноразмерный Pro 255  
D47\_HT-29\_FLucB

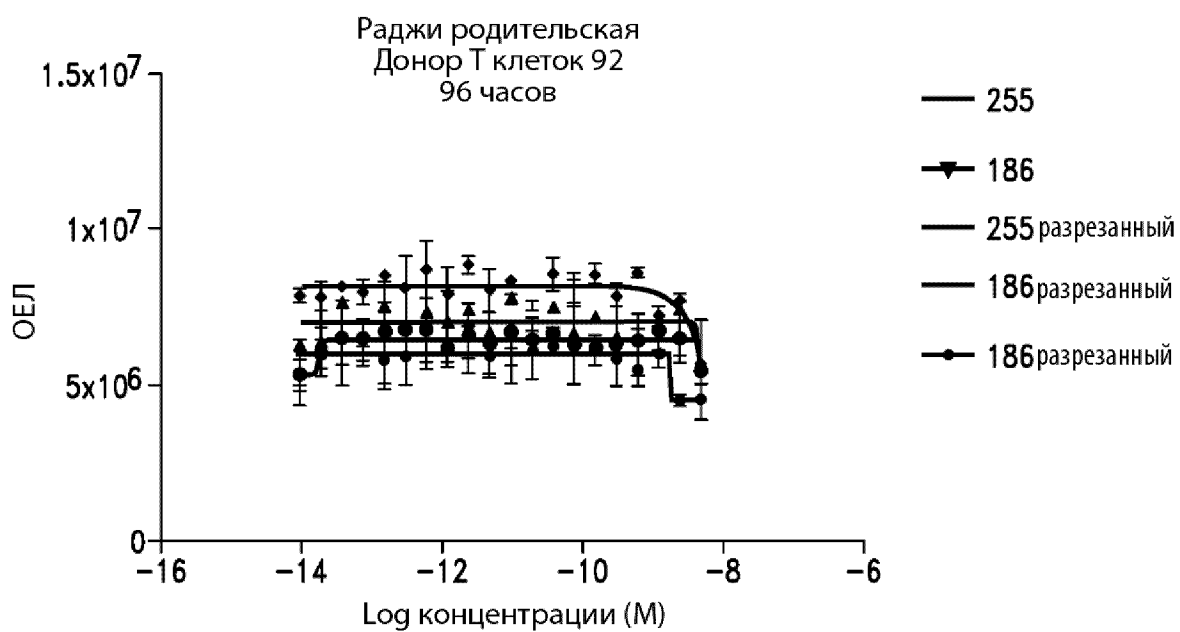


Конструкция	EC50 (пМ)
255	461.50
200разрезанный	10.08
201	0.52

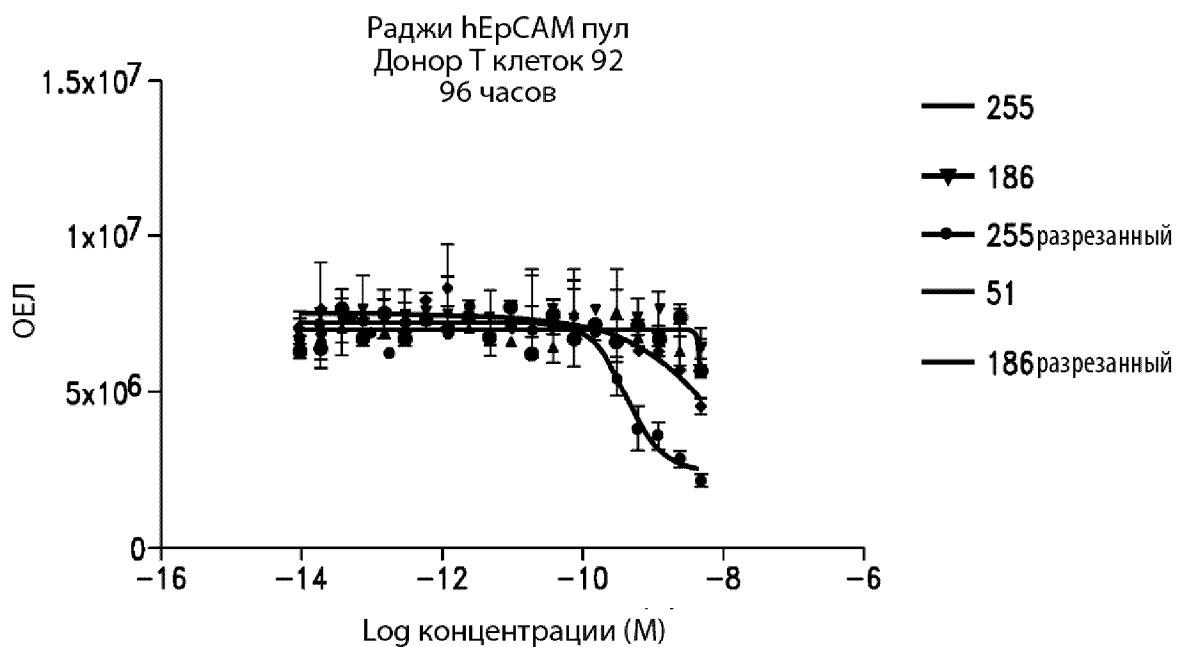
} 46x



78/105



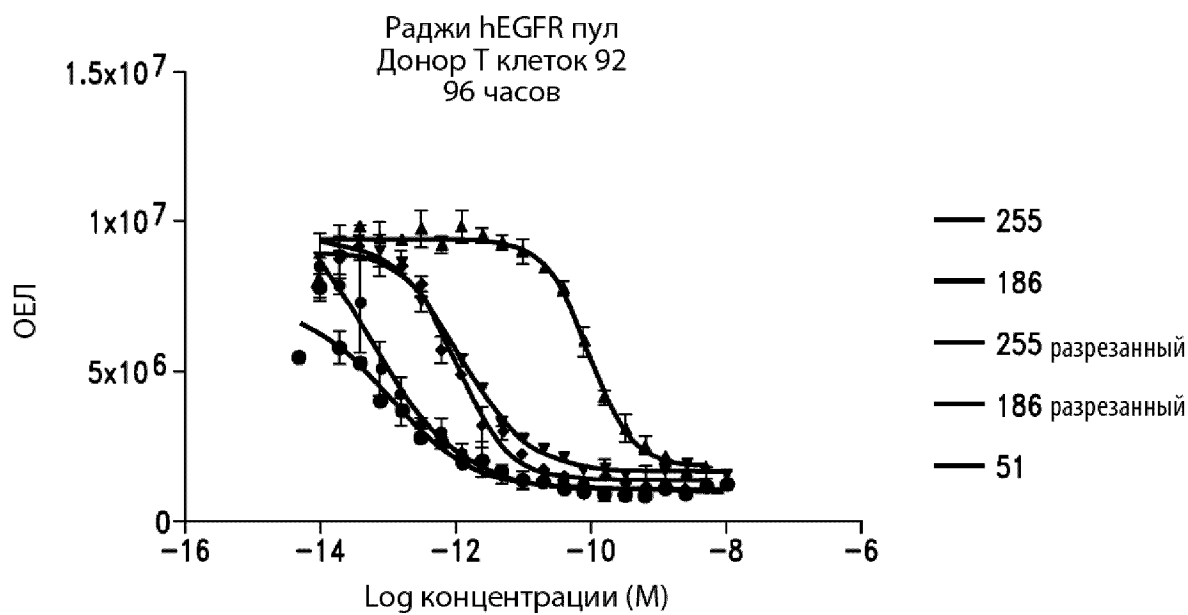
Фиг.57А



	IC50
255	$\sim 4.612e-009$
255 разрезанный	$4.462e-010$

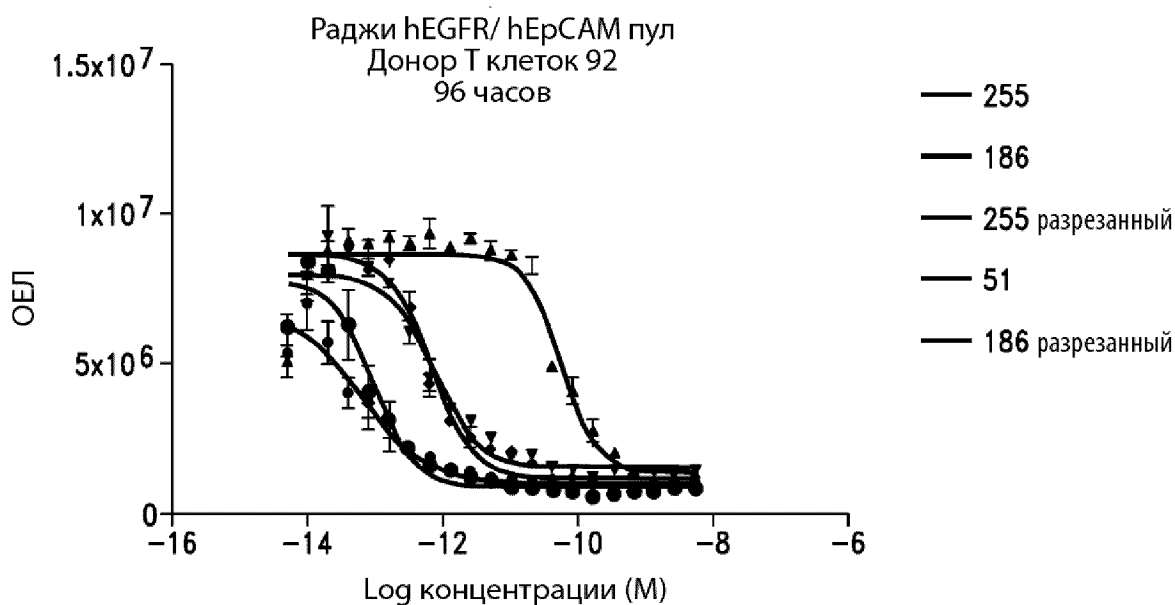
Фиг.57В

79/105



	IC50
255	9.205e-011
186	1.132e-012
255 разрезанный	1.082e-012
186 разрезанный	1.013e-013
51	5.329e-014

Фиг.57С



	IC50
255	5.29e-011
186	7.07e-013
255 разрезанный	6.288e-013
51	9.237e-014
186 разрезанный	5.862e-014

Фиг.57D

Фиг. 58

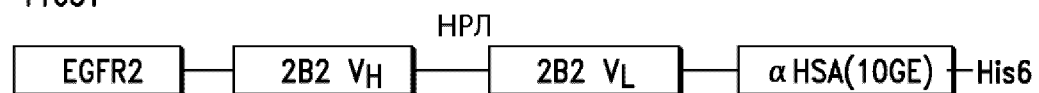
- Одноцелевая COBRA

Pro258



- αEGFR Позитивный контроль

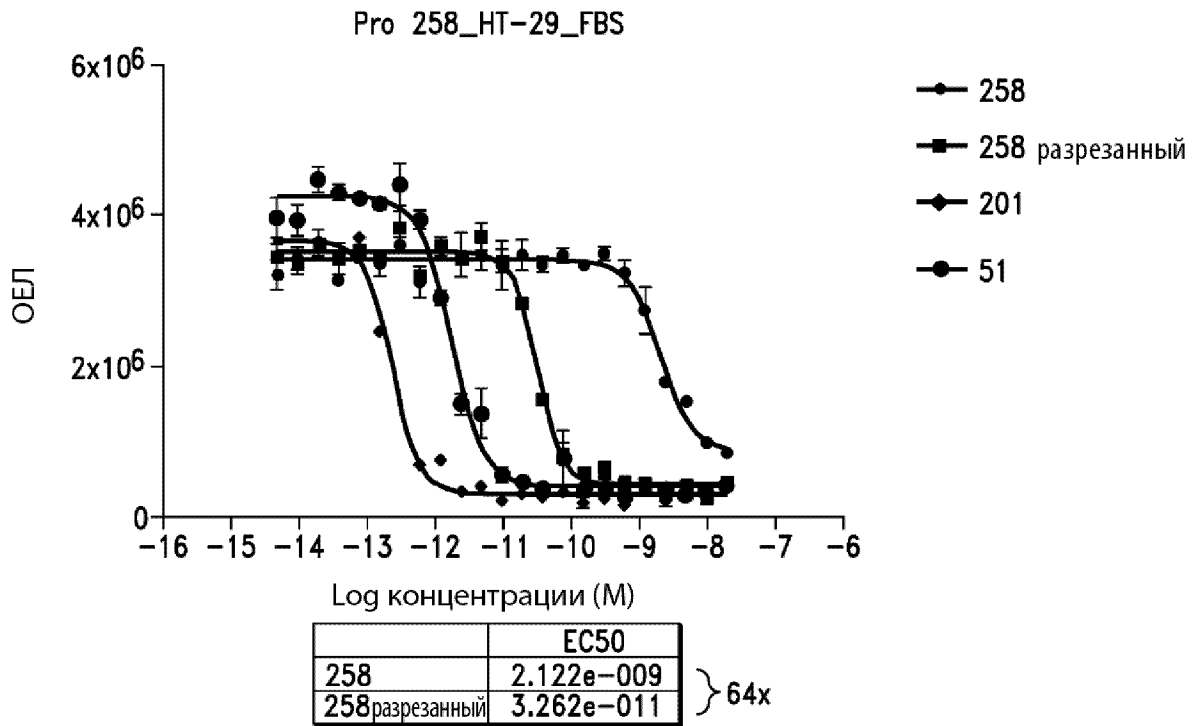
Pro51



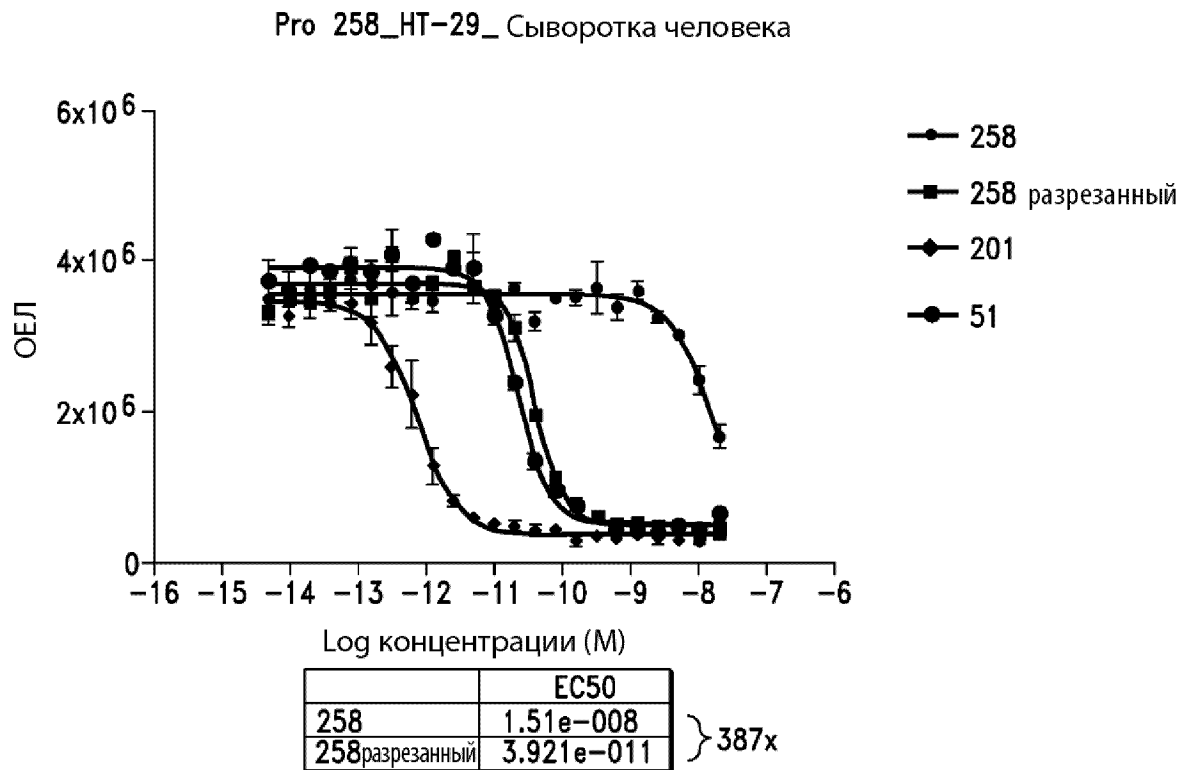
- Активный домен Pro186

Pro201

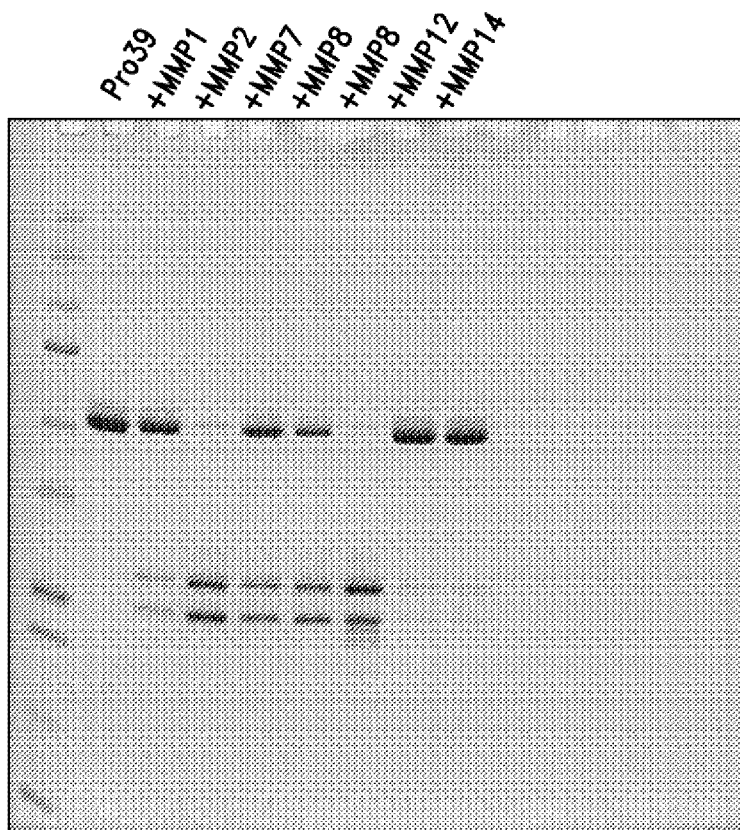




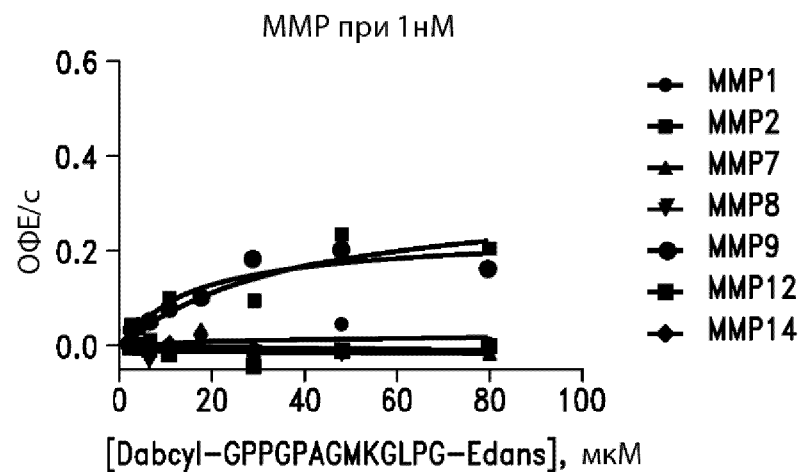
Фиг. 59А



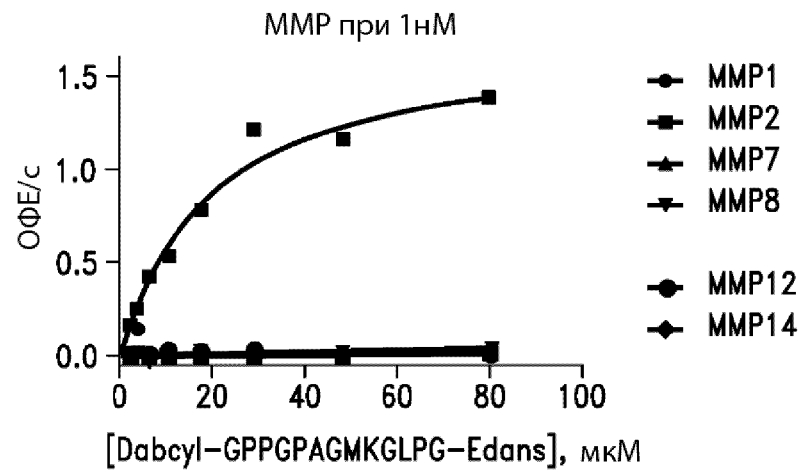
Фиг. 59В



Фиг. 60А



Фиг. 60В



Фиг. 60С

Фиг. 61А

**Формат 2**

- Pro186 – EGFR2/MMP9 (aEGFR),
- Pro225 – hF7/MMP9 (aB7H3)
- Pro226 – hF12/MMP9 (aB7H3)
- Pro233 – hEGFR2/MMP9 (aEGFR)
- Pro311 – h77.2/MMP9 (aFOLR1)
- Pro312 – h59.3/MMP9 (aFOLR1)
- Pro313 – h22.4/MMP9 (aFOLR1)
- Pro495 – hF7 MMP9 Vli2 + Vhi2 (aB7H3)

**Формат 2 - гетерологичный**

- Pro246 – hEGFR1/hEGFR2 MMP9 (aEGFR)
- Pro254 – hEGFR2/hEGFR1 MMP9 (aEGFR)
- Pro255 – hEGFR2/h13 MMP9 (aEGFR/aEpCAM)
- Pro256 – h13/hEGFR2 MMP9 (aEpCAM/aEGFR)
- Pro420 – h77.2/hEGFR2 MMP9 (aFOLR1/aEGFR)
- Pro421 – hEGFR2/h77.2 MMP9 (aEGFR/aFOLR1)
- Pro432 - h13/hEGFR1 MMP9 (aEpCAM/aEGFR)
- Pro479 – hF7/hF12 MMP9 (aB7H3)
- Pro480 – hF12/hF7 MMP9 (aB7H3)

**Двунацеленные Немі (Format 3)**

- Pro448 – h77.2/hEGFR2 MMP9 VH (aFOLR1/aEGFR)
- Pro449 – hEGFR2/h77.2 MMP9 VH (aEGFR/aFOLR1)
- Pro450 – h77.2/hEGFR2 MMP9 VL (aFOLR1/aEGFR)
- Pro451 – hEGFR2/h77.2 MMP9 VL (aEGFR/aFOLR1)

Фиг. 61В

Формат 1

Pro140 – EGFR2 MMP9 (aEGFR)

Pro140b – EGFR2 Mepnin (aEGFR)

Формат 2-варианты с разрезаемым линкером

Pro187 – EGFR2/Mepnin (aEGFR)

Pro221 – EGFR2/KLK7-6 (aEGFR)

Pro222 – EGFR2/KLK7-13 (aEGFR)

Pro223 – EGFR2/KLK7-11 (aEGFR)

Pro224 – EGFR2/KLK7-10 (aEGFR)

Pro393 – EGFR2/S9 (aEGFR)

Pro394 – EGFR2/ST14MV (aEGFR)

Pro395 – EGFR2/CathS (aEGFR)

Pro396 – EGFR2/MMP9v (aEGFR)

Pro429 – EGFR2/Mepnin/GranzymeB (aEGFR)

Pro430 – EGFR2/MMP9-2 (aEGFR)

Pro431 – EGFR2/ST14MS (aEGFR)

Формат 4

Pro258 – hEGFR2 MMP9 (aEGFR)

Pro356 – hEGFR1 MMP9 (aEGFR)

Pro359 – hF7 MMP9 (aB7H3)

Pro388 – h77.2 MMP9 (aFOLR1)

Pro364 – h59.3 MMP9 (aFOLR1)

## Фиг. 62А

Pro140 (Формат 1)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDST  
GYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARRIRSKYNNYATYYADQVKDRRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/GPAGMKGL/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
VTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE  
 YYCTTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGR  
TSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSL  
 KPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVV  
 TQEPSLTVSPGGTVTLTGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPA  
 RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQ  
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWRQAPGKGLEWWARRIRSKYDYKDDD  
DKADSVKDRRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
 LTVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPG  
 KGLEWWSSISGSGRDTLYAESVKGRRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL  
VSSQGLTVTVSS (SEQ ID NO:143)

Pro140b Формат 1

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDST  
GYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARRIRSKYNNYATYYADQVKDRRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/KKLADEPE/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTTLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRT  
SRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSL  
 PEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSKKLADEPEGGGS/QTVVT  
 QEPSLTVSPGGTVTLTGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPAR  
 FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQL  
 VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWRQAPGKGLEWWARRIRSKYDYKDDD  
KADSVKDRRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGL  
 TVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGK  
 GLEWWSSISGSGRDTLYAESVKGRRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSV  
SSQGLTVTVSS (SEQ ID NO:144)



## Фиг. 62В

Pro186 Формат 2

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVGISWRGDST  
GYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARRIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
VTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE  
 YYCTVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGR  
TSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVGISWRGDSTGYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSL  
 KPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/SGGPGPAGMKGLPGS/QTVV  
 TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPA  
 RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQ  
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWRQAPGKGLEWWARRIRSKYDYKDDD  
DKADSVKDRRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
 LTVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPG  
 KGLEWSSSISGSGRDTLYAESVKGRRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL  
VSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:145)

Pro187 Формат 2

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVGISWRGDST  
GYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TQVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARRIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
VTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE  
 YYCTVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGR  
TSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVGISWRGDSTGYADSVKGRRFTISRDNANTVDLQMNSL  
 KPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/GGGSKKLADPEGGGS/QTVV  
 TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPA  
 RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQ  
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWRQAPGKGLEWWARRIRSKYDYKDDD  
DKADSVKDRRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
 LTVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPG  
 KGLEWSSSISGSGRDTLYAESVKGRRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSL  
VSSQGTLVTVSS (SEQ ID NO:146)

## Фиг. 62С

**Pro225 (FL aB7H3 hF7 MMP9 линкер) Формат 2**

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGST  
VYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQ  
 TLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL TSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRT  
FHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSGGSTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL  
AEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPAR  
 FSGSLLGGKAAL TSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
 VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
 ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
 VSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGL  
 EWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
 QGTLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:147)

**Pro226 (FL aB7H3 hF12 MMP9 линкер) Формат 2**

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTS  
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGVLAHHNYEYDYWGQGLTV  
 VSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEW  
 VARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHANFGNS  
 YISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSG  
 NYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL TSGVQPEDEAEYYCTL  
 WYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPRTFSTY  
SMAWFRQAPGKERSFVAAINWSGGNTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDA  
VYYCAAGGVLAHHNYEYDYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTV  
SPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTPARFSGSLLG  
 GKAAL TSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGL  
 VQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDR  
 FTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGG**  
**GSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEWSSIS  
 GSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLTV  
 VSS/HHHHHH (SEQ ID NO:148)

## Фиг. 62D

Pro233(гуманизированный Pro 186)Формат 2

QVKLVESGGGVVRPGGSLTSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNLSRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVVRPGGSLTSCAASGRT  
 SRSYGMGWFRQAPGKEREVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNLSR  
 AEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVT  
 QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
 VESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
 ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
 TVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGL  
 EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANSLYLQMNLSRPEDEAVYYCTIGGSLSVSS  
 QGTLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:149)

Pro311 (FL aFOLR1 h77.2 MMP9 линкер)Формат 2

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTVSNVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYAD  
 SVKGRFTISRDNANSLYLQMNLSRAEDTAVYYVCNRFNFDRIYWGQGLTVTVSS/**GGGSGG**  
**GS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEWWARIRSKYNN  
 YATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQ  
 GLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWQK  
 PGGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCYCTLWYSNRWWFGG  
 GTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTVSNVMAWYRQTPG  
 NEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNLSRAEDTAVYYVCNRFNFDRIY  
 WGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGN  
 YPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKY  
 AMNWWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK  
 TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQ  
 PGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISR  
 DNANSLYLQMNLSRPEDEAVYYCTIGGSLSVSSQGTLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:150)

## Фиг. 62E

**Pro312 (FL aFOLR1 h59.3 MMP9 линкер)**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPGNTFSISAMGWYRQAPGKQREWVAVTHSDYSTN  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKHYGIDYWGQGTLVTVSS/**GGGS**  
**GGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEWARIRSKY  
 NNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYW  
 GGTLVTVSS/**GGSGGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWVQ  
 KPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWF  
 GGGTKLTVL/**GGSGGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPGNTFSISAMGWYRQA  
 PGKQREWVAVTHSDYSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKHYGI  
 DYWGQGTLVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVT  
 SGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGSGGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTF  
 NKYAMNWRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN  
 LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGGS**/EVQLVESGGGL  
 VQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTIS  
 RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID  
 NO:151)

**Pro313 (FL aFOLR1 h22.4 MMP9 линкер)Формат 2**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGTTFSRDVMGWYRQAPGKQRELVAIISRGGSTNY  
 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNANTATWGRVFWGQGTLVTVSS/**G**  
**GGSGGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEWARIR  
 SKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISY  
 AYWGQGTLVTVSS/**GGSGGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNW  
 VQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNR  
 WFGGGTKLTVL/**GGSGGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEASGTTFSRDVMGWY  
 RQAPGKQRELVAIISRGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNAN  
 TATWGRVFWGQGTLVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG  
 SSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTARFSGSLLGGKAALTLSGVQ  
 PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL/**GGSGGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS  
 CAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKN  
 TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGGSGGGGS**/EV  
 QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYA  
 ESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS/HHHHHH  
 (SEQ ID NO:152)

## Фиг. 62F

**Pro246 (FL haEGFR1/haEGFR2 гетерологичный COBRA with MMP9 линкер)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFFVAINWSSGSTY  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQ  
 GTLTVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPG  
 KGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHA  
 NFGNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEP SLTVSPGGTVTLT CASSTG  
 AVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL T LSGVQPEDEAE  
 YYCTLWYSNRWFFGGG TKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVWRP GGSLT LSCAASGR  
 TSRSYGMGWFRQAPGKEREFFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL  
 RAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTTLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVV  
 TQEP SLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PA  
 RFSGSLLGGKAAL T LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWFFGGG TKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQ  
 LVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDD  
 KADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT L V  
 TVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKG  
 LEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
 QGTTLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:153)

**Pro256 (FL haEpCAM VIB13/haEGFR1 гетерологичный COBRA MMP9 линкер)**

QVQLVESGGGLVQP GGSLT LSCAASGTGSIF SINLMGWYRQAPGKQRELVARITSGDSTV  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNLLLRSSPGATTPYWGQGT L TV  
 SS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAIN WWRQAPGKGLEW  
 ARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYI  
 SYWAYWGQGT L TVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEP SLTVSPGGTVTLT CASSTGAVTSGNY  
 PNWWQQKPGQAPRGLIGG TKFLVPGTPARFSGSLLGGKAAL T LSGVQPEDEAEYYCTLWY  
 SNRWFFGGG TKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVWRP GGSLT LSCAASGRTSRSYGM  
 GWFRQAPGKEREFFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAL Y  
 YCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT L TVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEP SLTV  
 SPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PARFSGSLLG  
 GKAAL T LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWFFGGG TKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGL  
 VQP GGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDR  
 FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT L TVTVSS/**GGG  
 GSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSIS  
 GSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT L TV  
 SS/HHHHHH (SEQ ID NO:154)

## Фиг. 62G

**Pro420 (FL aFOLR1 h77.2/haEGFR1 гетерологичный COBRA MMP9 линкер)**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYAD  
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYVCNRNFDRIYWGQGLTVTVSS/**GGGSGG**  
**GS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEWVARIRSKYNN  
YATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQ  
GTLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWQQK  
GQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWFFGG  
GTLKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGVVRP GGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPG  
KEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGS  
AWYGTLYEYDYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT  
CGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PARFSGSLLGGKAALTL SG  
VQPEDEAEYYCVLWYSNRWFFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP GGSLK  
LSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDD  
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/  
EVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTL  
YAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSS/HHHHH  
H (SEQ ID NO:155)

**Pro421 (FL haEGFR1/aFOLR1 h77.2 гетерологичный COBRA MMP9 линкер)**

QVKLVESGGGVVRP GGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQ  
TLTVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
GLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
VTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEY  
YCTLWYSNRWFFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT  
VSNVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT  
AVYYVCNRNFDRIYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVT  
LTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PARFSGSLLGGKAALTL  
SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWFFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP GGS  
LKLSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDD  
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**  
/EVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTL  
YAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSS/HHHHH  
H (SEQ ID NO:156)

## Фиг. 62H

**Pro393 (Pro186 S9 линкер)**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GARLQSAAPAGLKGAG**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
LTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDLYAESVKGRFTISRDNANTTLYLQMNLSLRLPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGTTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:157)

**Pro394 (Pro186 ST14(MV) линкер)**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSFTRQARVGGGS**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
LTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDLYAESVKGRFTISRDNANTTLYLQMNLSLRLPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGTTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:158)

## Фиг. 62I

**Pro395 (Pro186 CathS [линкер](#))**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSVGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREVSVGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSARLQSAAPGGGS**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
VSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:159)

**Pro396 (Pro186 MMP9v [линкер](#))**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSVGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREVSVGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GSGGPGPAGMHGLP**GGGS/QTVV  
TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQ  
LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDD  
KADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
TVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGL  
LEWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:160)



## Фиг. 62J

Pro 429 (Pro186 Меприн/Гранзим В линкер)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
 QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKG  
 LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
 GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
 TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
 CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
 RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSK  
 EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGGVYADSLEDGGGS**/QTVVTQ  
 EPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLV  
 ESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKA  
 DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTV  
 SS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLE  
 WSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTLQMNLSRNPEDTAVYYCTIGGSLVSSQ  
 GTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:161)

Pro430 (Pro186 MMP9-2линкер)

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
 QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKG  
 LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
 GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
 TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
 CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
 RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSK  
 EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGPGPAGLKGAPGS**/QTVVTQE  
 PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLV  
 SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKA  
 DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTV  
 SS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLE  
 WSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTLQMNLSRNPEDTAVYYCTIGGSLVSSQ  
 GTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:162)

## Фиг. 62К

**Pro431 (Pro186 ST14(MS)линкер)**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
 QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
 GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
 TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
 CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
 RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKP  
 EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**GGGSLSGRSDNHGGGS**/QTVVT  
 QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
 VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
 ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
 LTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNLSRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGL  
 EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTYLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
 QGTTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:163)

**Pro258 (Pro186 с единичным аEGFR доменом и центральным аЧА доменом)**

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNLSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQ  
 TLTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**SGGPGPAGMKGLPGS**/EVQLVESGGGLVQPGNLSRLS  
 CAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTYL  
 QMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPG  
 GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP  
 GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTIS  
 RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/HHHHHH  
 (SEQ ID NO:164)

## Фиг. 62L

**Pro221**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGGQNPYSAGRGGGS**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
VSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:165)

**Pro222**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTFKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGGQNPYSAGGGSGG**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
VSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTLTLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:166)

## Фиг. 62М

**Pro223**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCAASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGGRNVYSAGGGSGG**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYYCWLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
LTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGTTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:167)

**Pro224**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCAASSTGAV  
TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYY  
CTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS  
RSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKP  
EDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGGQNTWSAGKGGGS**/QTVVT  
QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
PARFSGSLLGGKAALTLGVPQPEDEAEYYCWLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQL  
VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDK  
ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
LTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGL  
EWWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
QGTTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:168)

## Фиг. 62N

**Pro254**

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSVGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGRT  
 FSSYAMGWFRQAPGKEREVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRA  
 EDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVV  
 TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQ  
 LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDD  
 KADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTV  
 TVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGK  
 LEWSSISGGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSS  
 QGTLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:169)

**Pro255**

QVKLVESGGGVVRPGGSLTLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREVSVGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGTG  
 SIFSINLMGWYRQAPGKQRELVARITSGDSTVYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRP  
 EDTAVYYCNLLLRSSPGATTPYWGQGLTVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSL  
 TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGG  
 GLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKADSVK  
 DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/**G**  
**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKLEWWS  
 SISGGRDTLYAESVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLV  
 TVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:170)

## Фиг. 620

**Pro262**

QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFEVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGT  
 QVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKG  
 LEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANF  
 GNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLT  
 CASSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ  
 PEDEAEYYCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVKLEESGGGSVQTGGSLRLT  
 CAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFEVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNANTVD  
 LQMNSLKPEDTAIYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPG**  
**S**/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDD  
 KGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGS**  
**GS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYD  
 YKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYW  
 GQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWVR  
 QAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG  
 GSLSVSSQGTTLTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:171)

**Pro356**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFEVAINWSSGSTY  
 YADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQ  
 GTLTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPG  
 KGLEWWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHA  
 NFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTG  
 AVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE  
 YYCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**SGGPGPAGMKGLPGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRL  
 SCAASGFTFSKFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNANTTLY  
 LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTVSPG  
 GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTTPARFSGSLLGGKA  
 ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP  
 GGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTIS  
 RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSS/HHHHHH  
 (SEQ ID NO:172)

## Фиг. 62P

Pro359

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFVAVINWSSGGST  
 VYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQG  
 TLVTVSS/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/SGGPGPAGMKGLPGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS  
 CAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYL  
 QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSTVSPG  
 GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PARFSGSLLGGKA  
 ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQP  
 GGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WWRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTIS  
 RDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/HHHHHH  
 (SEQ ID NO:173)

Pro364

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAPGNTFSISAMGWYRQAPGKQREWAVTHSDYSTN  
 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCKHYGIDYWGQGLTVTVSS/GGGS  
GGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEWARIRSKY  
 NNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYW  
 GQGLTVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWQQ  
 KPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWWF  
 GGGTKLTVL/SGGPGPAGMKGLPGS/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFGM  
 SWWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTAVY  
 YCTIGGSLSVSSQGLTVTVSS/GGGSGGGS/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAV  
 TSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE  
 YYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/GGGSGGGS/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF  
 TFNKYAMN WWRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM  
 NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:174)

## Фиг. 62Q

Pro388

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYAD  
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGSGG**  
**GS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNN  
YATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQ  
GTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWQQKP  
GQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWFGG  
GTKLTVL/**SGGPGPAGMKGLPGS**/EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSW  
VRQAPGKGLEWSSISGSRDTLYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT  
IGGSLSVSSQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSG  
NYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC  
VLWYSNRWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK  
YAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK  
TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:175)



## Фиг. 62R

**Pro432**

QVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASGTGSIFSINLMGWYRQAPGKQRELVARITSGDSTV  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCNLLLRSSPGATTPYWGQGLVTV  
 SS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEW  
 ARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYI  
 SYWAYWGQGLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNY  
 PNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWY  
 SNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGRTFSSYAM  
 GWFRQAPGKEREFFVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  
 YCAAGYQINSGNYNFKDYEDYWGQGLVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSTV  
 TVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTTPARFSGSL  
 LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGG  
 GLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVK  
 DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS/**G**  
**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWWS  
 SISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTV  
 TVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:176)

**Pro448**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYAD  
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNRNFDRIYWGQGLVTVSS/**GGGGSG**  
**GGS**/QVKLVESGGGVWRPGGSLTSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFFVSGISWRG  
 DSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYW  
 GQGLVTVSS/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQ  
 APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV  
 RHANFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSTVSPGGT  
 VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTTPARFSGSLLGGKAAL  
 TLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQP  
 GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEWWSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN  
 AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:177)

## Фиг. 62S

Pro449

QVKLVESGGGVVRPGGSLTSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
GYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
TLVTVSS/**GGGSGGGS**/QVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTP  
GNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIY  
WGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVR  
QAPGKGLEWARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC  
VRHANFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPSLTVSPG  
GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT PARFSGSLLGGKA  
ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLV  
QPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISR  
DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID  
NO:178)

Pro450

QVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNSVMAWYRQTPGNEREFVAIINSIGITNYAD  
SVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRNFDRIYWGQGTLVTVSS/**GGGSGG**  
**GS**/QVKLVESGGGVVRPGGSLTSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRG  
DSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYW  
GQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWQ  
QKPGQAPRGLIGGKFLVPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWW  
FGGGTKLTVL/**SGGPGPAGMKGLPGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA  
MNWVRQAPGKGLEWARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE  
DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQ  
GNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDN  
AKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:179)

## Фиг. 62Т

**Pro451**

QVKLVESGGGVVRPGGSLTSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFSVSGISWRGDST  
 GYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAAAGSAWYGTLYEYDYWGQG  
 TLVTVSS/**GGGSGGGS**/QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNVMAWYRQTP  
 GNEREFVAIINSIGITNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYVCNRFDRY  
 WGQGTTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNW  
 VQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNR  
 WFGGGTKLTVL/**SGGPGPAGMKGLPGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNK  
 YAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK  
 TEDAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLV  
 QPNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEWSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISR  
 DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTTLVTVSS/HHHHHH (SEQ ID  
 NO:180)

**Pro479**

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFSVAVINWSSGST  
 VYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQG  
 TLVTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWRQAPGK  
 GLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPR  
 FSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSSGNTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA  
 EDTAVYYCAAGVLAHHNYEYDYWGQGTTLVTVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEP  
 SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGTARFSG  
 SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVES  
 GGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKAD  
 SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLVTV  
 S/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSKFGMSWRQAPGKGLEW  
 VSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT  
 LTVTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:181)

## Фиг. 62U

**Pro480**

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASPRTFSTYSMAWFRQAPGKERSFVAAINWSSGGNTS  
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGVLAAHNYEYDYWGQGT  
 VSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGKGLEW  
 VARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNS  
 YISYWAYWGQGT  
 TVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSG  
 NYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL  
 WYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTY  
 HMGWFRQAPGKEREFAVINWSSGGSTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT  
 AVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGT  
 TVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVTQEPS  
 LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGDYKDDDDKGT  
 PARFSGS  
 LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLVESG  
 GGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYDYKDDDDKADSV  
 KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
 TVSS/  
**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS  
 CAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEW  
 SSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT  
 LTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:182)

**Pro495**

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRTFHTYHMGWFRQAPGKEREFAVINWSSGGST  
 VYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQ  
 GTLTVSS/**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAINWWRQAPGK  
 GLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHAN  
 FGNSYISYWAYWGQGT  
 TVSS/**GGGSGGGS**/QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGA  
 VTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKFLVPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY  
 YCTLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAPSRRT  
 FHTYHMGWFRQAPGKEREFAVINWSSGGSTVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR  
 AEDTAVYYCAAGGATTQRATEASYDYWGQGT  
 TVSS/**SGGPGPAGMKGLPGS**/QTVVT  
 QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGKDDAPGTPARF  
 SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCWLWYSNRWWFGGGTKLTVL/**GGGSGGGS**/EVQLV  
 ESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKHAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATAYAD  
 SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT  
 LTVSS/  
**GGGSGGGS**/EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS  
 CAASGFTFSKFGMSWWRQAPGKGLEW  
 VSSISGSGRDTLYAESVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGT  
 LTVSS/HHHHHH (SEQ ID NO:183)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2018/049774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. C07K16/18 C07K16/28 C07K16/30 A61P35/00  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C07K A61K A61P  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/046778 A2 (AMGEN INC [US]) 31 March 2016 (2016-03-31) claims 1-39; figures 1-5; examples 1-5 -----	1-49
X	WO 2010/081173 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS LLC [US]; STAGLIANO NANCY E [US]; WEST JAMES W [US]) 15 July 2010 (2010-07-15) paragraphs [0005], [0013]; claims 1-13; figures 1-3 -----	1-49
X	WO 2016/179285 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS INC [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) paragraph [0336] - paragraph [437y]; claims 1-100y ----- -/--	1-49

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  18 April 2019	Date of mailing of the international search report  26/04/2019
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Le Flao, Katell
--	---

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/049774

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2018/049774

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
  
1-49(partially)
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-49(partially)

A protein according to claims 1 or 2 or a composition according to claims 19 or 25, binding to a tumor target antigen (TTA), CD3 and human serum albumin, corresponding to the general formats 1, 2, 4 described at pages 2-3, [0005] to [006] ; these proteins and compositions wherein the first sdABD-TTA binds EGFR and is either SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, or SEQ ID NO:13.

---

2. claims: 1-49(partially)

A protein according to claims 1 or 2 or a composition according to claims 19 or 25, binding to EpCAM, CD3 and human serum albumin, corresponding to the general formats 1, 2 or 4 described at pages 2-3, [0005] to [006], further characterised by the sdABD-TTA binding EpCAM consisting of SEQ ID NO: 37 or SEQ ID NO: 41 (which is identical to SEQ ID NO 37) .

---

3. claims: 1-49(partially)

A protein according to claims 1 or 2 or a composition according to claims 19 or 25, binding to FOLR1, CD3 and human serum albumin, corresponding to the general formats 1, 2 or 4 described at pages 2-3, [0005] to [006], further characterised by the sdABD-TTA binding FOLR1 consisting of SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21 or SEQ ID NO 25.

---

4. claims: 1-49(partially)

A protein according to claims 1 or 2 or a composition according to claims 19 or 25, binding to B7H3, CD3 and human serum albumin, corresponding to the general formats 1, 2 or 4 described at pages 2-3, [0005] to [006], further characterised by the first sdABD-TTA binding B7H3 consisting of SEQ ID NO: 29 or SEQ ID NO 33.

---



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2018/049774

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/156570 A1 (ABLYNX NV [BE]) 6 October 2016 (2016-10-06) page 36, line 17 - line 28; claims 1-11; examples 12,13; sequences 110,111,115 page 38, line 3 - line 4 -----	1-49
A	WO 2007/042289 A2 (ABLYNX NV [BE]; LAEREMANS TOON [BE]; DE HAARD HANS [NL]; HOOGENBOOM HE) 19 April 2007 (2007-04-19) claims 1-37; examples 1-14; sequence 91 -----	1-49
A	WO 2016/180969 A1 (ABLYNX NV [BE]) 17 November 2016 (2016-11-17) claims 1-91; examples 23-28; sequence 352 -----	1-49
A	CHAD MAY ET AL: "Advances in bispecific biotherapeutics for the treatment of cancer", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, vol. 84, no. 9, 1 November 2012 (2012-11-01), pages 1105-1112, XP055071310, ISSN: 0006-2952, DOI: 10.1016/j.bcp.2012.07.011 figure 1; tables 1,2 -----	1-49
A	FRANKEL STANLEY R ET AL: "Targeting T cells to tumor cells using bispecific antibodies.", CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY JUN 2013, vol. 17, no. 3, June 2013 (2013-06), pages 385-392, XP002787546, ISSN: 1879-0402 the whole document -----	1-49
X	WO 2011/033105 A1 (MICROMET AG [DE]; ZUGMEIER GERHARD [DE] ET AL.) 24 March 2011 (2011-03-24) claims 1-39; examples 1-5 -----	1-49
X	WO 2013/083809 A1 (AMGEN RES MUNICH GMBH [DE]) 13 June 2013 (2013-06-13) claims 1-23; examples 1-3 -----	1-49
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2018/049774

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRANCESCA FERRARI ET AL: "Solitomab, an EpCAM/CD3 bispecific antibody construct (BiTE?), is highly active against primary uterine and ovarian carcinosarcoma cell lines in vitro", JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON UK, vol. 34, no. 1, 17 October 2015 (2015-10-17), page 123, XP021230211, ISSN: 1756-9966, DOI: 10.1186/S13046-015-0241-7 page 2, column 1, paragraph 2 -----	1-49
A	FOSSATI MARCO ET AL: "Immunological changes in the ascites of cancer patients after intraperitoneal administration of the bispecific antibody catumaxomab (anti-EpCAManti-CD3)", GYNECOLOGIC ONCOLOGY, vol. 138, no. 2, 2015, pages 343-351, XP029249222, ISSN: 0090-8258, DOI: 10.1016/J.YGYNO.2015.06.003 the whole document -----	1-49
A	WO 2011/144749 A1 (ABLYNX NV [BE]; MERCK PATENT GMBH [DE]; KNUEHL CHRISTINE [DE]; HOCK BJ) 24 November 2011 (2011-11-24) claim 11; sequence 273 -----	1-49
X,P	WO 2017/156178 A1 (MAVERICK THERAPEUTICS INC [US]) 14 September 2017 (2017-09-14) claims 1-58; examples 1-8 -----	1-49

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/049774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2016046778	A2	31-03-2016	AU 2015323313 A1	16-03-2017
			CA 2960128 A1	31-03-2016
			EP 3197916 A2	02-08-2017
			JP 2017529853 A	12-10-2017
			US 2017247476 A1	31-08-2017
			WO 2016046778 A2	31-03-2016
			WO 2010081173	A2
AU 2016225810 A1	22-09-2016			
AU 2018214147 A1	30-08-2018			
BR PI1006141 A2	23-02-2016			
CA 2749339 A1	15-07-2010			
CN 102482347 A	30-05-2012			
CN 106995495 A	01-08-2017			
EP 2385955 A2	16-11-2011			
JP 5851842 B2	03-02-2016			
JP 6271476 B2	31-01-2018			
JP 2012514982 A	05-07-2012			
JP 2015193654 A	05-11-2015			
JP 2017200955 A	09-11-2017			
RU 2011133819 A	20-02-2013			
RU 2017136814 A	08-02-2019			
US 2010189651 A1	29-07-2010			
US 2012149061 A1	14-06-2012			
US 2012207756 A1	16-08-2012			
US 2013309230 A1	21-11-2013			
US 2014024810 A1	23-01-2014			
US 2016228546 A1	11-08-2016			
US 2017081397 A1	23-03-2017			
WO 2010081173 A2	15-07-2010			
WO 2016179285	A1	10-11-2016	AU 2016257929 A1	30-11-2017
			BR 112017023872 A2	24-07-2018
			CA 2984948 A1	10-11-2016
			CN 107849133 A	27-03-2018
			EA 201792414 A1	29-06-2018
			EP 3292150 A1	14-03-2018
			JP 2018520091 A	26-07-2018
			KR 20180010203 A	30-01-2018
			US 2016355587 A1	08-12-2016
			WO 2016179285 A1	10-11-2016
			WO 2016156570	A1
CA 2981398 A1	06-10-2016			
CN 107646039 A	30-01-2018			
EP 3277316 A1	07-02-2018			
JP 2018511610 A	26-04-2018			
US 2018086837 A1	29-03-2018			
WO 2016156570 A1	06-10-2016			
WO 2007042289	A2	19-04-2007	AU 2006301426 A1	19-04-2007
			CA 2624781 A1	19-04-2007
			CN 101321784 A	10-12-2008
			EP 1934259 A2	25-06-2008
			JP 2009511032 A	19-03-2009
			WO 2007042289 A2	19-04-2007
WO 2016180969	A1	17-11-2016	AU 2016259792 A1	14-12-2017

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2018/049774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2985698 A1	17-11-2016
		EP 3294768 A1	21-03-2018
		US 2019112392 A1	18-04-2019
		WO 2016180969 A1	17-11-2016
-----			
WO 2011033105	A1 24-03-2011	AU 2010297258 A1	29-03-2012
		BR 112012008345 A2	09-08-2016
		CA 2774732 A1	24-03-2011
		CN 102711825 A	03-10-2012
		EP 2477653 A1	25-07-2012
		JP 2013505223 A	14-02-2013
		KR 20120083359 A	25-07-2012
		NZ 598601 A	30-05-2014
		RU 2012115480 A	27-10-2013
		SG 179027 A1	27-04-2012
		SG 10201405434V A	30-10-2014
		US 2012244161 A1	27-09-2012
		WO 2011033105 A1	24-03-2011
-----			
WO 2013083809	A1 13-06-2013	AR 089114 A1	30-07-2014
		AU 2012350429 A1	11-07-2013
		TW 201322985 A	16-06-2013
		UY 34504 A	28-06-2013
		WO 2013083809 A1	13-06-2013
-----			
WO 2011144749	A1 24-11-2011	AU 2011254557 A1	13-12-2012
		BR 112012029588 A2	25-07-2017
		CA 2791951 A1	24-11-2011
		CN 102906118 A	30-01-2013
		EP 2571901 A1	27-03-2013
		JP 6120767 B2	26-04-2017
		JP 2013529079 A	18-07-2013
		KR 20130080790 A	15-07-2013
		NZ 603570 A	24-12-2014
		RU 2012149227 A	27-06-2014
		SG 185354 A1	28-12-2012
		US 2013136748 A1	30-05-2013
		US 2019023796 A1	24-01-2019
		WO 2011144749 A1	24-11-2011
-----			
WO 2017156178	A1 14-09-2017	AU 2017229687 A1	20-09-2018
		BR 112018068189 A2	05-02-2019
		CA 3016165 A1	14-09-2017
		CN 109071667 A	21-12-2018
		EP 3426689 A1	16-01-2019
		KR 20180120245 A	05-11-2018
		SG 11201807548S A	27-09-2018
		TW 201808990 A	16-03-2018
		US 2018134789 A1	17-05-2018
		WO 2017156178 A1	14-09-2017
-----			