

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392788** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.06

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.04

(54) **УЛУЧШЕННЫЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ВМА031**

(31) **21172352.3; 63/184,698**

(32) **2021.05.05**

(33) **EP; US**

(86) **PCT/EP2022/062018**

(87) **WO 2022/233957 2022.11.10**

(71) Заявитель:

**ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Бунк Себастьян, Хофманн Мартин,
Унвердорбен Феликс (DE)**

(74) Представитель:

**Костюшенкова М.Ю., Джермакян
Р.В., Строкова О.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина Е.М.
(RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, специфически связывающемуся с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/кластер дифференцировки 3 (CD3). Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую антигенсвязывающий полипептид, или вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам-хозяевам, содержащим антигенсвязывающий полипептид, фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающий полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор и/или клетку-хозяин. Кроме того, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, нуклеиновой кислоте, вектору, клетке-хозяину или фармацевтической композиции для применения в медицине, в частности для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания. Настоящее изобретение также относится к способу улучшения или поддержания связывания и/или улучшения стабильности антигенсвязывающих полипептидов. Настоящее изобретение также относится к способу обнаружения, определения или обогащения Т-клеток, экспрессирующих комплекс TCR α/β /CD3.

A1

202392788

202392788

A1

УЛУЧШЕННЫЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ВМА031

ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, специфически связывающемуся с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/кластер дифференцировки 3 (CD3). Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую антигенсвязывающий полипептид, или вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным клеткам-хозяевам, содержащим антигенсвязывающий полипептид, фармацевтическим композициям, содержащим антигенсвязывающий полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор и/или клетку-хозяина. Кроме того, настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, нуклеиновой кислоте, вектору, клетке-хозяину или фармацевтической композиции для применения в медицине, в частности, для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания. Настоящее изобретение также относится к способу улучшения или поддержания связывания и/или улучшения стабильности антигенсвязывающих полипептидов. Настоящее изобретение также относится к способу обнаружения, определения или обогащения Т-клеток, экспрессирующих комплекс TCR α/β /CD3.

Можно выделить два типа Т-лимфоцитов на основе экспрессии двух типов соответствующих TCR: либо TCR α/β , либо TCR γ/δ . TCR α/β экспрессируются на большинстве Т-лимфоцитов человека (приблизительно > 80%), тогда как TCR γ/δ экспрессируются до степени < 20% на Т-клетках человека в периферических лимфоидных органах и крови, а также в большинстве эпителиальных тканей. TCR α/β распознают чужеродные антигены, связанные с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС, Borst *et al.*, Human Immunology, 29, 175-188, 1990). Мышиное антитело ВМА031 направлено против человеческого комплекса TCR α/β /CD3 (Borst *et al.*, 1990). Гуманизированные антитела, специфические в отношении TCR α/β , получены на основе мышиного моноклонального антитела ВМА031 (Shearman *et al.*, The Journal of Immunology, vol. 147, 4366-4373, no: 12, 1991, или EP 0403156A1). Однако гуманизированные варианты ВМА031, такие как EUCIV3, показали более низкое связывание по сравнению с мышиным ВМА031 (Shearman *et al.*, 1991). Другие гуманизированные варианты ВМА031 также были раскрыты в предшествующем уровне техники и было показано, что они индуцируют клеточно-опосредованный цитолиз (Shearman *et al.*, 1990). Таким образом,

гуманизированные молекулы ВМА031 могут обеспечить значительный медицинский потенциал для улучшения иммунотерапии заболеваний и нарушений, например, пролиферативных заболеваний. Однако известные до настоящего времени гуманизированные варианты ВМА031 имеют недостаток либо низкого связывания, либо плохой стабильности.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в гуманизированных вариантах ВМА031, которые эффективно связываются и обладают благоприятной стабильностью.

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим полипептидам, которые происходят из ВМА031 и которые специфически связываются с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$. Антигенсвязывающие полипептиды содержат представленные в настоящем документе замены. В частности, антигенсвязывающие полипептиды содержат замену (замены) согласно настоящему изобретению на положительно заряженную аминокислоту:

(i) в одном или нескольких из следующих положений тяжелой цепи: 30, 31, 53 и 54, и/или

(ii) в одном или нескольких из следующих положений легкой цепи: 31 и 56, и причем положения соответствуют нумерации Кабата. Кроме того, предлагаемые в настоящем документе антигенсвязывающие полипептиды содержат замену согласно настоящему изобретению в положении 90 согласно нумерации Кабата (например, гистидина (H) в положении 90) на тирозин (Y)). Антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению подходят для использования в различных форматах антител с использованием методов конструирования антител, таких как, среди прочего, описанные в Brinkmann *et al.*, MABS2017, Vol. 9, No. 2, 182–212. Антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению обеспечивают, среди прочего, следующие преимущества по сравнению с уровнем техники: (i) повышенное связывание с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, и/или (ii) повышенную стабильность, в частности термическую стабильность, по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим предусмотренные в настоящем документе замены. Кроме того, неожиданно было продемонстрировано, что комбинации предложенных в настоящем документе замен обеспечивают синергические эффекты, приводящие к улучшенному связыванию с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Более того, антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению улучшают эффекторную функцию рекрутированных Т-клеток, например, улучшают медицинские эффекты по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению. Антигенсвязывающие полипептиды согласно

настоящему изобретению, содержащие эффекторную молекулу, например, если антигенсвязывающий полипептид представляет собой биспецифическую молекулу и содержит, среди прочего, TCR (например, молекулу TCER®), могут приводить к усилению эффекторной функции рекрутированных Т-клеток, например, уничтожения опухолевых клеток, по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению. Соответственно, предложенные в настоящем документе замены в антигенсвязывающем полипептиде могут привести к улучшению медицинских свойств антигенсвязывающего полипептида.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду, содержащему переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52,

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой A или N,

X₂ представляет собой E или Q, и/или

X₃ представляет собой Q или K

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR) 1-4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54,

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55,

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LFR) 1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) положение 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату содержит замену на остаток тирозина (Y),

и где антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или вектору нуклеиновой кислоты, содержащему указанную нуклеиновую кислоту.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или нуклеиновую кислоту, или вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновую кислоту или вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения или клетку-хозяин согласно третьему аспекту настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоте или вектору согласно второму аспекту настоящего изобретения, или клетке-хозяину согласно третьему аспекту настоящего изобретения, или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту настоящего изобретения для применения в медицине.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоте или вектору согласно второму аспекту настоящего изобретения, или клетке-хозяину согласно третьему аспекту настоящего изобретения, или фармацевтической композиции согласно пятому аспекту настоящего изобретения для применения для

диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания, предпочтительно рака.

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к способу улучшения или поддержания связывания и/или улучшения стабильности антигенсвязывающего полипептида согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение относится к способу обнаружения, определения или обогащения Т-клеток, экспрессирующих комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$.

Дополнительные аспекты, среди прочего, относятся к способам получения антигенсвязывающих полипептидов и/или наборов, содержащих антигенсвязывающие полипептиды, и также описаны в настоящем документе далее.

Краткое описание чертежей

Ниже описывается содержание чертежей, включенных в настоящее описание. В этом контексте делается ссылка на подробное описание настоящего изобретения выше и/или ниже.

Фиг. 1. Скрининг связывания и специфичности выбранных клонов scFv после выбора фагового дисплея. Анализ связывания проточной цитометрией проводили с использованием клеточной линии Jurkat, клон E6-1 (ось y) и клеток J.RT3T3.5 (ось x). ScFv ВМА031 (V36) (светлые треугольники) служил эталоном, а анти-CD3 антитело (светлые кружки) служило положительным контролем связывания с мишенью. Отобранные клоны (закрашенные кружки) с улучшенным окрашиванием целевых положительных клеток были отправлены на дальнейший анализ. Пунктирные линии представляют фоновое окрашивание соответствующих клеточных линий без scFv, но включая детекторное антитело.

Фиг. 2. Связывание выбранных вариантов Fab после фагового дисплея. Очищенные Fab наносили на клеточную линию Jurkat, клон E6-1, в виде серии титрования с концентрациями в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл, и окрашивание детектировали с помощью антитела против метки His. Связывание под кривой (AUC) рассчитывали на основе медианной интенсивности флуоресценции (MFI) и логарифмизированных концентраций. Пунктирная линия представляет AUC связывания иллюстративного родительского антитела TRP-1374.

Фиг. 3. Скрининг связывания и специфичности выбранных вариантов Fab после фагового дисплея. Очищенные Fab наносили на клеточную линию Jurkat, клон E6-1, и клетки J.RT3T3.5 в концентрации 1 мкг/мл и окрашивание детектировали с помощью

антитела против метки His. Пунктирная линия представляет фоновый сигнал без присутствия Fab.

Фиг. 4. Скрининг связывания и специфичности разработанных вариантов Fab. Очищенные Fab наносили на клеточную линию Jurkat, клон E6-1, и клетки J.RT3T3.5 в концентрации 1 мкг/мл и окрашивание детектировали с помощью антитела против метки His. Пунктирная линия представляет фоновый сигнал без присутствия Fab.

Фиг. 5. Площадь связывания под кривой и температура плавления разработанных вариантов Fab. Очищенные Fab наносили на клеточную линию Jurkat, клон E6-1, в серии титрования концентраций в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл, и AUC связывания рассчитывали на основе полученных кривых связывания (левая ось Y). Температуру плавления (T_m) рассчитывали на основе измерений nanoDSF (правая ось Y). Верхняя панель представляет варианты только с мутированными CDR, нижняя панель дополнительно включает варианты, несущие каркасную мутацию H90Y. Стрелки указывают взаимосвязь вариантов с мутацией H90Y каркасной области 3 тяжелой цепи (HFR3) и без нее. *: температуру плавления VH_Y53R_VL_VL_wt (TPP-1378) не определяли. Жирная пунктирная линия указывает T_m VH_wt_VL_wt (TPP-1374, иллюстративное родительское антитело). Пунктирная линия указывает AUC связывания VH_wt_VL_wt (TPP-1374).

Фиг. 6. Связывание клеток-мишеней разработанных вариантов Fab. Очищенные Fab наносили на клеточную линию Jurkat, клон E6-1, в серии титрования с концентрациями в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл, и окрашивание детектировали с помощью антитела против метки His.

Фиг. 7. Эффективность модифицированных молекул BMA031 в контексте формата TCER®. Эффективность молекул очищенного рецептора, привлекающего T-клетки (TCER®), оценивали с помощью анализов высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH). Линии опухолевых клеток, презентующих различные уровни целевого пептида HLA (pHLA) на их клеточной поверхности (Hs695T, U2OS), а также линию опухолевых клеток, отрицательных по целевому пептиду-человеческому лейкоцитарному антигену (pHLA) (T98G), использовали в качестве мишеней для мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных у здорового HLA-A*02-положительного донора HBC-1005 (E:T = 10:1) в присутствии повышающихся концентраций молекул TCER®. Цитолиз, индуцированный TCER®, оценивали количественно через 48 часов путем измерения высвобожденной LDH. Значения EC50 кривых зависимости ответа от дозы рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой.

Фиг. 8. Эффективность модифицированных молекул ВМА031 в контексте формата TCER®. Эффективность очищенных молекул TCER® оценивали с помощью анализов высвобождения LDH. Линии опухолевых клеток, презентующих различные уровни целевого pHLA на своей клеточной поверхности (Hs695T, U2OS), а также целевую линию pHLA-отрицательных опухолевых клеток (T98G) применяли в качестве мишеней для РВМС, полученных у здорового HLA-A*02-положительного донора НВС. -1039 (Е:Т = 10:1) при повышении концентрации молекул TCER®. Цитолиз, индуцированный TCER®, определяли количественно через 48 часов путем измерения высвобожденного LDH. Значения EC50 кривых зависимости ответа от дозы рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой.

Прежде чем настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящем документе, поскольку они могут варьироваться. Также следует отметить, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники.

В настоящем документе цитируются несколько документов. Каждый из документов, цитируемых в настоящем документе (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т.д.), как выше, так и ниже, включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения. Некоторые из цитируемых в настоящем документе документов охарактеризованы как «включенные посредством ссылки». В случае противоречия между определениями или идеями таких включенных ссылок и определениями или идеями, изложенными в настоящем описании, текст настоящего описания имеет приоритет.

Ниже будут описаны элементы настоящего изобретения. Эти элементы перечислены вместе с конкретными вариантами осуществления, однако, следует понимать, что их можно комбинировать любым способом и в любом количестве для создания дополнительных вариантов осуществления. По-разному описанные примеры и предпочтительные варианты осуществления не следует рассматривать как ограничивающие настоящее изобретение только явно описанными вариантами осуществления. Следует понимать, что настоящее

описание поддерживает и охватывает варианты осуществления, которые объединяют подробно описанные варианты осуществления с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в настоящей заявке следует считать раскрытыми в описании настоящей заявки, если из контекста не следует иное.

Для практического применения настоящего изобретения, если не указано иное, используются традиционные методы химии, биохимии и методы рекомбинантной ДНК, которые объяснены в литературе в данной области (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Ниже представлены некоторые определения терминов, часто используемых в настоящем описании. Эти термины в каждом случае их использования в оставшейся части описания будут иметь соответственно определенное значение и предпочтительные значения.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Термин «антигенсвязывающий полипептид» относится в контексте настоящего изобретения к полипептидам или связывающим белкам, которые способны специфически связываться по меньшей мере с одним антигеном, в частности, с эпитопом указанного антигена. Антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению содержит определяющие комплементарность области (CDR) 1-CDR3, которые являются частью переменного домена.

Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), которые могут содержаться в одной и той же или разных полипептидных цепях. VH и VL содержат определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR) антитела или его фрагмента, как определено в настоящем документе ниже. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит VH и VL, как определено в настоящем документе ниже, где конкретные положения в VH и/или конкретные положения в VL содержат положительно заряженные аминокислоты по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом или его фрагментом, который не содержит положительно заряженных аминокислот в соответствующих положениях. Другими словами, указанные специфические аминокислотные положения содержат замены на положительно заряженные аминокислоты в антигенсвязывающем полипептиде согласно настоящему изобретению. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид или его

функциональные фрагменты содержат CDR, в которых по меньшей мере одна аминокислота из аминокислот, которые не имеют положительного заряда, заменена положительно заряженной аминокислотой. Положение 30 в FR1 тяжелой цепи может содержать замену на положительно заряженную аминокислоту. Кроме того, положение 90 в FR3 тяжелой цепи содержит замену на тирозин в соответствии с нумерацией по Кабату в антигенсвязывающем полипептиде.

Антигенсвязывающий полипептид в контексте настоящего изобретения относится к полипептиду, который содержит паратоп (альтернативно называемый «антигенсвязывающий сайт»), который специфически связывается с антигеном. Примерами антигенсвязывающих полипептидов являются, среди прочего, антитела или их фрагменты или одноцепочечные антитела. Антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению или его функциональный фрагмент специфически связывается с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$ или комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Согласно некоторым аспектам антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению или его функциональный фрагмент не связываются специфически с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$ яванского макака. Согласно дополнительным аспектам антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению не связывается специфически с клетками, экспрессирующими T-клеточный рецептор γ/δ (TCR). Согласно дополнительным аспектам антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом CD3.

Согласно некоторым дополнительным аспектам антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению или его функциональный фрагмент специфически связывается с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$ человека. Другими словами, антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению или его функциональный фрагмент не связываются специфически с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$ любого другого вида, кроме человека.

Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит последовательности CDR, как определено в прилагаемой формуле изобретения и ниже, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена положительно заряженной аминокислотой, как определено ниже. Предпочтительно не более четырех аминокислотных положений содержат замены на положительно заряженную аминокислоту в CDR антигенсвязывающего полипептида. Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере переменные домены VH и VL, которые происходят из последовательностей антител BMA031 или последовательностей антител BMA031(V36),

как определено в настоящем документе ниже, которые обозначены как эталонное антитело, родительский антигенсвязывающий полипептид или родительское антитело и будут определены ниже. Антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению содержат домены VH и VL, содержащие консенсусные последовательности, которые основаны на антителах, нацеленных на комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, и содержат предложенные в настоящем документе замены. Иллюстративные последовательности таких антител раскрыты ниже. Как показано в прилагаемых примерах, введение конкретных замен на положительно заряженные аминокислоты и/или замены в положении 90 в HFR3 в переменных доменах родительского антигенсвязывающего полипептида, например, ВМА031(V36), обеспечило продемонстрированные в настоящем документе положительные эффекты, например, повышенное связывание и/или повышенную стабильность по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим предусмотренных в настоящем документе замен. Согласно некоторым дополнительным аспектам антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению может также обладать повышенной стабильностью, по существу сохраняя или сохраняя связывание по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим представленных в настоящем документе замен. Согласно некоторым дополнительным аспектам предложенный в настоящем документе антигенсвязывающий полипептид также может иметь повышенное связывание, при этом по существу сохраняя или сохраняя стабильность антигенсвязывающего полипептида по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим предложенные в настоящем документе замены. Термин «по существу» в контексте «по существу сохраняя связывание» означает, что связывание (например, выраженное в «% увеличения связывания AUC») существенно не изменяется, т.е. не изменяется более чем на уменьшение приблизительно на 25%, предпочтительно приблизительно на 15%. более предпочтительно приблизительно на 10% и еще более предпочтительно приблизительно на 5% по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Термин «по существу» в контексте «по существу сохраняя стабильность» означает, что стабильность существенно не изменяется, т.е. изменяется не более чем на уменьшение приблизительно на 25%, более предпочтительно приблизительно на 15%, более предпочтительно приблизительно на 10% и даже более. предпочтительно приблизительно на 5% по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Термин «вариабельный домен» относится в контексте настоящего изобретения к участку иммуноглобулина, который определяется на основе гомологии последовательностей, известной специалисту. Обычно два вариабельных домена образуют

сайт связывания антигена. Неограничивающими примерами таких доменов являются переменный домен легкой цепи, содержащийся в легкой цепи антитела (VL), переменный домен тяжелой цепи, содержащийся в тяжелой цепи антитела (VH), альфа-переменный домен, содержащийся в альфа-цепи молекулы TCR ($V\alpha$) или бета-переменный домен, содержащийся в бета-цепи TCR ($V\beta$).

Термин «определяющая комплементарная область» (CDR) относится в контексте настоящего изобретения к несмежным антигенсвязывающим сайтам, обнаруживаемым в переменных доменах иммуноглобулинов, например, в VH, VL, $V\alpha$ и $V\beta$. CDR были описаны в Lefranc *et al.* (2003) *Developmental and Comparative Immunology* 27:55, Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977), Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest", 1991, Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987, и аннотация Contact (MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) для аннотации Contact), Abhinandan and Martin, *Mol. Immunol.* (2008), 45(14):3832-9, для аннотации AbM, IMGT (Lefranc MP. Unique database numbering system for immunogenetic analysis, *Immunol. Today* (1997) 18:509), где определения включают перекрытие или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител, или их вариантов или фрагментов, подразумевает, что оно находится в пределах объема термина, определенного и используемого в настоящем документе. Аминокислотные остатки, которые охватываются CDR, как определено в каждой из цитируемых выше ссылок, в качестве примера представлены ниже в Таблице 1 для сравнения.

Таблица 1. Нумерация CDR согласно различным аннотациям антитела BMA031(V36).

	Кабат ¹	Chothia ²	AbM ³		Contact ⁴
HCDR1	31-35	26-32	26-35	HCDR1	30-35
HCDR2	50-65	52-56	50-58	HCDR2	47-58
HCDR3	95-102	95-102	95-102	HCDR3	93-101
LCDR1	24-34	24-34	24-34	LCDR1	31-36
LCDR2	50-56	50-56	50-56	LCDR2	46-55
LCDR3	89-97	89-97	89-97	LCDR3	89-96

¹Нумерация остатков соответствует номенклатуре Kabat *et al.*, см. выше

²Нумерация остатков соответствует номенклатуре Chothia *et al.*, см. выше

³Нумерация остатков соответствует номенклатуре AbM, Abhinandan and Martin, см. выше,

⁴Нумерация остатков соответствует номенклатуре Contact, MacCallum *et al.*, см. выше.

Термины «HCDR1», «HCDR2» и «HCDR3» относятся в контексте настоящего изобретения к первой, второй и третьей CDR в переменном домене тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида, например, антитела или его функционального фрагмента. В контексте настоящего изобретения термины «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» относятся соответственно к первой, второй и третьей CDR в переменном домене легкой цепи антигенсвязывающего полипептида, например, антитела или его фрагмента. В контексте настоящего изобретения термины «CDR1», «CDR2» и «CDR3» относятся соответственно к первой, второй и третьей CDR переменной области любой цепи антигенсвязывающего полипептида, например, антитела или его функционального фрагмента. Антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению содержат замены на положительно заряженные аминокислоты, например, в CDR, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, который не имеет положительно заряженных остатков в соответствующих положениях. Положения аминокислот в CDR, а также аналогичные положения аминокислот в VH или VL, назначаются в соответствии с аннотациями Кабата, Chothia, AbM или Contact, как описано выше, в частности, в соответствии с нумерацией по Кабату.

Термин «каркасная область» (FR) относится в контексте настоящего изобретения ко всем аминокислотным остаткам вне областей CDR внутри переменного домена антигенсвязывающего полипептида, например, антитела или его фрагмента. Каркасная область обычно представляет собой прерывистую аминокислотную последовательность длиной приблизительно 100-120 аминокислот, но она предназначена для ссылки только на те аминокислоты, которые находятся за пределами CDR. В контексте настоящего изобретения термин «каркасная область» предназначен для обозначения каждого домена каркаса, который разделен CDR. FR1 - FR4 относится к каркасной области 1, которая представляет собой первую N-концевую аминокислотную последовательность переменного домена, за которой следуют FR2, FR3 и FR4, которые перемежаются CDR1, 2 и 3, соответственно. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающие полипептиды настоящего изобретения содержат замену (замены) в каркасной области, например, в каркасной области 3 тяжелой цепи (HFR3).

Термин «полипептид» относится в контексте настоящего изобретения к одной линейной цепи аминокислот, связанных друг с другом пептидными связями, и обычно содержит по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90 или по меньшей мере около 100 аминокислот. В настоящем документе также предусматривается, что антигенсвязывающий полипептид, представленный в настоящем

документе, имеет длину ниже указанного диапазона, при условии, что антигенсвязывающий полипептид содержит замены согласно настоящему изобретению и специфически связывается с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Полипептид может представлять собой одну цепь белка, состоящую из более чем одной цепи, или сам белок, если белок состоит из одной цепи.

Термин «белок» относится к функциональной единице, которая может содержать одну или несколько полипептидных цепей. Если белок содержит две или более полипептидные цепи, они могут быть нековалентно и/или ковалентно связаны друг с другом.

Термин «антигенсвязывающий сайт» относится в контексте настоящего изобретения к по меньшей мере одному сайту связывания, который отвечает за специфическое и/или селективное связывание с представляющим интерес целевым антигеном, в частности с эпитопом целевого антигена. Термин «антигенсвязывающий сайт» используется взаимозаменяемо с термином «паратоп» в контексте настоящего изобретения и относится к части антигенсвязывающего полипептида, которая связывается с антигеном. Иллюстративные сайты связывания включают переменный домен антитела, такой как переменный домен тяжелой цепи или переменный домен легкой цепи, переменный домен TCR, такой как переменный домен альфа или бета или переменный домен гамма или дельта. Согласно конкретным аспектам антигенсвязывающие полипептиды, описанные в настоящем документе, содержат несколько (например, два, три, четыре или более) сайтов связывания.

Термин «антиген» или «целевой антиген» относится в контексте настоящего изобретения к молекуле или части молекулы или комплекса, которые способны связываться по меньшей мере с одним антигенсвязывающим сайтом, причем указанный один антигенсвязывающий сайт, например, содержится в антителе, TCR и/или в антигенсвязывающих полипептидах согласно настоящему изобретению.

Термин «эпитоп» относится в контексте настоящего изобретения к функциональному эпитопу антигена. Функциональный эпитоп содержит остатки, обычно аминокислоты или полисахариды, которые способствуют нековалентному взаимодействию между паратопом антигенсвязывающего полипептида и антигеном. Нековалентное взаимодействие включает электростатические силы, силы Ван-дер-Воллса, водородные связи и гидрофобное взаимодействие, соответственно. Функциональный эпитоп представляет собой подгруппу остатков, которые составляют структурный эпитоп антигенсвязывающего полипептида. Структурный эпитоп включает все остатки, которые охватываются антигенсвязывающим полипептидом, т.е. область узнавания

антигенсвязывающего полипептида. Обычно функциональный эпитоп антигена, связываемого антителом, содержит от 4 до 10 аминокислот. Аналогично, функциональный эпитоп пептида, который презентирован МНС, обычно содержит от 4 до 8 аминокислот. Конкуренция между двумя антителами возникает, если структурные эпитопы антител идентичны или перекрываются.

Термин «комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$ » относится в контексте настоящего изобретения к комплексу Т-клеточного рецептора, присутствующему на поверхности Т-клеток. Большинство Т-клеток экспрессируют TCR α/β , состоящие из α - и β -цепей, связанных дисульфидными связями, которые обычно связывают сложные поверхности антигенных пептидов, презентированных МНС. TCR не передают сигнал сами по себе, а конститутивно связаны с CD3, белковым комплексом, который обозначен как корецептор Т-клеток и содержит внутриклеточные сигнальные мотивы (Birnbaum *et al.*, PNAS vol. 11, no. 49, 17576-17581, 2014). TCR α/β нековалентно связан с этим консервативным многосубъединичным сигнальным аппаратом, который включает димеры CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ и CD3 $\zeta\zeta$, которые вместе образуют комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$ содержит эпитоп, который специфически связывается антигенсвязывающими полипептидами согласно настоящему изобретению. Специфическая аминокислотная последовательность целевого эпитопа антитела ВМА031 (Shearman *et al.*, 1991) или представленных в настоящем документе антигенсвязывающих полипептидов не известна. Однако антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению связываются с тем же или подобным функциональным эпитопом, что и ВМА031 или ВМА031 (V36), и, таким образом, конкурируют друг с другом. Соответственно, эпитопная специфичность антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению характеризуется их способностью конкурировать с «эталонным антителом» за связывание с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, предпочтительно Т-клетками, в частности, за связывание с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, присутствующим на поверхности Т-клеток. Таким образом, предлагаемые в настоящем документе антигенсвязывающие полипептиды могут конкурировать с эталонным антителом, которое специфически связывается с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, предпочтительно ВМА031 или даже более предпочтительно ВМА031 (V36), за связывание с Т-клетками, в частности за связывание с Т-клетки, экспрессирующие комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, более предпочтительно за связывание с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, присутствующим на поверхности Т-клеток. Т-клетки предпочтительно представляют собой Т-лимфоциты, более предпочтительно клетки Jurkat, например, клетки клона Е6-1. Следует отметить, что антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению были разработаны на основе последовательностей вышеупомянутых эталонных антител, т.е.

ВМА031 или ВМА031 (V36). Конкуренцию между эталонным антителом и антигенсвязывающим полипептидом можно проверить с помощью известных методов анализа. Например, можно использовать анализ связывания, как описано в прилагаемых в настоящем документе примерах. В частности, конкуренцию между эталонным антителом и антигенсвязывающим полипептидом можно протестировать с помощью анализа проточной цитометрии, как дополнительно описано ниже, например, FACS, где связывание эталонного антитела с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительными клетками определяли в присутствии антигенсвязывающего полипептида и сравнивали со связыванием только эталонного антитела. Примером TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительных клеток являются Т-клетки, предпочтительно клетки Jurkat. В конкурентном анализе предпочтительно использовать антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению, который содержит часть Fc, например, антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению содержит элементы антитела. Например, эталонное антитело может содержать константные домены, полученные из мышиного IgG1, тогда как антигенсвязывающий полипептид может содержать константные домены, полученные из человеческого IgG1. В таком эксперименте эталонное антитело, используемое в концентрации приблизительно EC50 связывания, определенной ранее, инкубируется в присутствии или в отсутствие эквимольной концентрации антигенсвязывающего полипептида на TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительных клетках. Затем можно определить связывание эталонного антитела с использованием вторичных реагентов, специфичных для мышей, например, козьего F(ab')₂ анти-мышиный IgG1 (Fc)-RPE (Dianova, SBA-1072-09) на второй стадии окрашивания. На конкуренцию эталонного антитела и антигенсвязывающего полипептида указывает снижение связывания эталонного антитела в присутствии антигенсвязывающего полипептида по сравнению со связыванием только эталонного антитела. Предпочтительно эталонное антитело снижает связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, в частности TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительными клетками, по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%.

В контексте настоящего изобретения термин «эталонное антитело» в контексте конкурентного анализа, определяется его переменным доменом тяжелой и легкой цепи и предпочтительно дополнительно содержит константный домен IgG1 и легкую цепь Сκ. Предпочтительно эталонное антитело содержит константный домен человеческого IgG1. Более предпочтительно эталонное антитело содержит область шарнир-CH₂-CH₃ согласно SEQ ID NO: 61. Предпочтительно эталонное антитело содержит VH согласно SEQ ID NO: 1 и VL согласно SEQ ID NO: 2, более предпочтительно ВМА031 (V36), состоящее из

тяжелой цепи (HC) согласно SEQ NO: 60 и легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO. 6. Эталонное антитело не содержит замен согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше и ниже. В частности, эталонное антитело не содержит замену (замены) на положительно заряженную аминокислоту. Предпочтительно эталонное антитело не содержит замену (замены) на положительно заряженную аминокислоту и/или замену на тирозин в положении 90 тяжелой цепи.

«Родительский антигенсвязывающий полипептид» обычно относится к антигенсвязывающему полипептиду, с которым сравнивают антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению, например, при оценке таких свойств, как T_m , EC_{50} или % увеличения связывания AUC. «Родительский антигенсвязывающий полипептид» не содержит замен согласно настоящему изобретению, как определено в настоящем документе выше и ниже. В частности, родительский антигенсвязывающий полипептид не содержит замену (замены) на положительно заряженную аминокислоту. Предпочтительно родительский антигенсвязывающий полипептид не содержит замену (замены) на положительно заряженную аминокислоту и/или замену на тирозин в положении 90 тяжелой цепи. Эффект замен согласно настоящему изобретению предпочтительно следует сравнивать между двумя сходными молекулами, т.е. молекулами, которые отличаются только заменами согласно настоящему изобретению согласно первому аспекту настоящего изобретения. Таким образом, «родительский антигенсвязывающий полипептид» может относиться в некоторых аспектах к молекуле, которая содержит VH согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36) и VL согласно SEQ ID NO: 2 (VL BMA031 V36) и которая в остальном имеет аминокислотную последовательность антигенсвязывающего полипептида. Согласно предпочтительному варианту осуществления родительский антигенсвязывающий полипептид имеет аминокислотную последовательность антитела, например, BMA031 (V36), или представляет собой его функциональный фрагмент, например, Fab, и в контексте настоящего изобретения его называют «родительским антителом» согласно настоящему изобретению.

«Родительское антитело» не содержит замен, как определено в контексте настоящего изобретения. Примером такого «родительского антитела» является BMA031 или другой гуманизированный вариант BMA031, например BMA031 (V36), как описано ниже, или предпочтительно его фрагмент. Родительское антитело определяется своим переменным доменом тяжелой и легкой цепей, предпочтительно родительское антитело содержит VH согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36) и VL согласно SEQ ID NO: 2 (VL BMA031 V36). Термин «родительское антитело» также используется в контексте сравнительной молекулы в определенных ниже вариантах осуществления и примерах,

например, определение связывания (например, EC50 или % увеличение связывания AUC) или определение температуры плавления (Tm).

Согласно предпочтительным вариантам осуществления родительский антигенсвязывающий полипептид содержит или состоит из доменов VH и VL ВМА031(V36), как определено в настоящем документе.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, как в разделе примеров, функциональные характеристики, такие как «% увеличения связывания AUC», «EC50 связывания» и/или «Tm», дополнительно описанные в настоящем документе ниже, определяются, когда антигенсвязывающий полипептид и родительский антигенсвязывающий полипептид имеют один и тот же формат, например, Fab-фрагмент, как описано в примере 1.

Сравнение антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению и родительского антигенсвязывающего полипептида осуществляют в сходных, предпочтительно идентичных экспериментальных условиях, предпочтительно параллельно, более предпочтительно антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению и родительский антигенсвязывающий полипептид являются частью одного и того же анализа. Наиболее предпочтительно функциональные свойства описанного в настоящем документе антигенсвязывающего полипептида сравнивают с родительским антигенсвязывающим полипептидом, когда оба присутствуют в виде Fab или Fab-фрагмента.

Термин «T-клеточный рецептор» (TCR) относится в контексте настоящего изобретения к гетеродимерному белку клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, который связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигнала. TCR существуют в формах α/β и γ/δ , которые структурно подобны, но имеют совершенно разное анатомическое расположение, а также, предположительно, разные функции. Внеклеточная часть нативных гетеродимерных $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR содержит по два полипептида, каждый из которых имеет проксимальный к мембране константный домен и дистальный к мембране переменный домен. Каждый из константных и переменных доменов включает внутрицепочечную дисульфидную связь. Переменные домены содержат высокополиморфные петли, аналогичные определяющим комплементарность областям (CDR) антител. Термин «TCR» относится в контексте настоящего изобретения также к их фрагментам, а также к одноцепочечным TCR и их фрагментам, в частности, к переменным альфа- и бета-доменам однодоменных TCR, а также к химерным, гуманизированным, биспецифическим или мультиспецифическим TCR. Использование генной терапии TCR преодолевает ряд

текущих препятствий. Это позволяет снабдить собственные Т-клетки субъектов (пациентов) желаемой специфичностью и генерировать достаточное количество Т-клеток за короткий период времени, избегая их истощения. TCR будет трансдуцирован в эффективные Т-клетки (например, Т-клетки центральной памяти или Т-клетки с характеристиками стволовых клеток), что может обеспечить лучшую персистенцию, сохранность и функцию после переноса. Т-клетки, сконструированные с помощью TCR, вводят онкологическим больным, у которых лимфопения вызвана химиотерапией или облучением, что позволяет эффективно приживить трансплантат, но ингибировать подавление иммунитета.

Термин «фрагменты TCR» относится в контексте настоящего изобретения к части полноразмерного TCR или TCR дикого типа, в частности, к антигенсвязывающему сайту или варибельной области такого TCR. Примеры фрагментов TCR включают фрагменты цепи α , β , δ или γ , такие как V_{α} - C_{α} или V_{β} - C_{β} или их части. Эти фрагменты могут также дополнительно содержать соответствующую шарнирную область или одноцепочечные варибельные домены, такие как V_{α} , V_{β} , V_{δ} , V_{γ} , одноцепочечные фрагменты V_{α}/V_{β} или биспецифические и мультиспецифические TCR, образованные из фрагментов TCR. Фрагменты TCR выполняют идентичные функции по сравнению с встречающимися в природе полноразмерными TCR или TCR дикого типа, т.е. фрагменты селективно и/или специфически связываются со своими антигенами-мишенями, в частности с антигенными пептидами или пептидами-мишенями в комплексе с главным комплексом гистосовместимости I или II (MHC I или MHC II).

Термин «одноцепочечный TCR (scTCR)» относится в контексте настоящего изобретения к белку или антигенсвязывающему полипептиду, в котором варибельные домены TCR, такие как V_{α} и V_{β} или V_{δ} и V_{γ} , расположены на одной полипептидной цепи. Обычно варибельные домены разделены линкером, причем указанный линкер обычно содержит от 10 до 30, например, от 10 до 25 аминокислот.

Термин «гетеродимерные TCR альфа-бета дикого типа» относится в контексте настоящего изобретения к TCR, имеющему альфа-цепь и бета-цепь. Каждая альфа-цепь содержит варибельную, соединительную и константную области, а бета-цепь также обычно содержит короткую область варибельности между варибельной и соединительной областями, но эту область варибельности часто рассматривают как часть соединительной области. Константные или С-области альфа- и бета-цепей TCR обозначаются как TRAC и TRBC, соответственно (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10). Каждая варибельная область, называемая в настоящем документе альфа-варибельным доменом и бета-варибельным доменом, содержит три

CDR, встроенные в каркасную последовательность, одна из которых представляет собой гипервариабельную область, называемую CDR3. CDR альфа-вариабельного домена в настоящем документе называют CDRa1, CDRa2, CDRa3, а CDR бета-вариабельного домена в настоящем документе называют CDRb1, CDRb2, CDRb3. Существует несколько типов вариабельных областей альфа-цепи (Valpha) и несколько типов вариабельных областей бета-цепи (Vbeta), отличающихся своим каркасом, последовательностями CDR1 и CDR2, а также частично определенной последовательностью CDR3. Типы Valpha обозначают в номенклатуре IMGT уникальным номером TRAV, типы Vbeta обозначают в номенклатуре IMGT уникальным номером TRBV (Folch and Lefranc, (2000), *Exp Clin Immunogenet* 17(1): 42-54, Scaviner and Lefranc, (2000), *Exp Clin Immunogenet* 17(2): 83-96, LeFranc and LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press). Для получения дополнительной информации о генах иммуноглобулиновых антител и TCR см. international ImMunoGeneTics information system®, Lefranc M-P et al (*Nucleic Acids Res.* 2015 Jan, 43 (Database issue):D413-22). Таким образом, обычный антигенсвязывающий сайт TCR обычно включает шесть CDR, включающих набор CDR из каждой вариабельной области альфа- и бета-цепи где последовательности CDR1 и CDR3 релевантны для распознавания и связывания пептидного антигена, который связывается с белком HLA, и последовательности CDR2 релевантны для распознавания и связывания белка HLA.

Термин «антитело», также называемый «иммуноглобулин», относится в контексте настоящего изобретения к антигенсвязывающему полипептиду, содержащему две тяжелые цепи, которые связаны друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью. Существует два типа легких цепей: лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов тяжелых цепей (или изоформ), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит отдельные домены последовательности. Легкая цепь включает два домена или области: вариабельный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь включает четыре домена, вариабельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, вместе называемые CH). Вариабельные области как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание связывания и специфичность антигена. Домены константных областей легкой (CL) и тяжелой (CH) цепей придают важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антител, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Фрагмент Fv представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из вариабельных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела состоит в структурной комплементарности между сайтом связывания антитела или паратопом и

антигенной детерминантой. Сайты связывания антител состоят из остатков, которые в основном происходят из гипервариабельных или определяющих комплементарность областей (CDR). Иногда остатки негипервариабельного или FR влияют на общую структуру домена и, следовательно, на сайт связывания антигена. CDR относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность связывания и специфичность естественной области Fv нативного сайта связывания иммуноглобулина. Примерами антитела или иммуноглобулина являются IgM, IgD, IgG, IgA или IgE. CDR антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению можно привить в антитела, биспецифические антитела или мультиспецифические антитела. Зная аминокислотную последовательность CDR, например, антитела, TCR или антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению, специалист в данной области техники может определить каркасные области, такие как каркасные области антитела или каркасные области TCR. Однако в случаях, когда CDR не указаны, специалист в данной области техники может сначала определить аминокислотные последовательности CDR на основе определения IMGT для антител, а затем определить аминокислотные последовательности каркасных областей.

Антигенсвязывающий полипептид может содержать антитело или его фрагмент, содержащий предложенные в настоящем документе замены. Термин «антитело» относится в контексте настоящего изобретения также к антителам и их фрагментам, а также к однодоменным антителам и их фрагментам и мультиспецифическим антителам и их фрагментам, в частности, к вариабельной области тяжелой цепи однодоменного антитела, химерному, гуманизированному, биспецифическому или мультиспецифическому антителам. «Фрагменты антител» включают часть интактного антитела, в частности сайт связывания антигена или вариабельную область антитела. Фрагменты предложенных в настоящем документе антител содержат представленную в настоящем документе замену (замены). Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диатела, биспецифические и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагмент антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как вариабельная область тяжелой цепи (V_HH). Предпочтительно «фрагменты антитела» содержат часть интактного антитела, в частности, содержат сайт связывания антигена, содержащий по меньшей мере CDR вариабельного домена, которые содержат положительно заряженные аминокислоты в соответствующих положениях CDR, как определено в настоящем документе ниже. Фрагменты антигенсвязывающих полипептидов или антител выполняют по существу те же или те же функции по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом или антителом, из которого они получены

(например, часть антигенсвязывающего полипептида или антитела), т.е. фрагменты антител специфически связываются с их мишенью. Фрагменты предлагаемого в настоящем документе антигенсвязывающего полипептида или фрагменты антител, содержащиеся в антигенсвязывающих полипептидах, такие как функциональные варианты, определенные в настоящем документе ниже, имеют улучшенное или повышенное связывание и/или T_m по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или родительским антителом. Особенно предпочтительно фрагменты, как определено в настоящем документе, приводят к улучшению связывания или снижению EC_{50} связывания по меньшей мере в 2 раза и/или к улучшению T_m по меньшей мере на 1°C или к ΔT_m по меньшей мере на 1°C , как определено в настоящем документе ниже, и по сравнению с родительским антителом.

Термин «каркасная область человека» относится в контексте настоящего изобретения к каркасной области, которая по существу идентична (приблизительно 85% или более, в частности 90%, 95%, 97%, 99%) или идентична (100%) к каркасной области природного антигенсвязывающего полипептида, такого как встречающееся в природе человеческое антитело или человеческий TCR.

Термин «гуманизированное антитело» относится в контексте настоящего изобретения к антителу, которое полностью или частично нечеловеческого происхождения и которое было модифицировано для замены определенных аминокислот, в частности, в каркасных областях тяжелой и легкой цепей, чтобы избежать или минимизировать иммунный ответ у людей. Константные домены гуманизированного антитела представляют собой в основном домены тяжелой и легкой цепи человека. Способы гуманизации последовательностей антител известны в данной области техники (Almagro & Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633). Одним из широко используемых методов является прививка CDR или изменение формы антитела, что включает прививку последовательностей CDR донорского антитела, обычно мышиного антитела, в каркасный остов человеческого антитела различной специфичности. Поскольку прививка CDR может снизить специфичность и аффинность связывания, а, следовательно, и биологическую активность нечеловеческого CDR-привитого антитела, обратные мутации могут быть введены в выбранных положениях CDR-привитого антитела, чтобы сохранить специфичность связывания и аффинность родительского антитела. Аминокислотные остатки, являющиеся частью CDR, обычно не изменяются, хотя в некоторых случаях может быть желательно изменить отдельные аминокислотные остатки CDR, например, для удаления сайта гликозилирования, сайта дезамидирования, сайта изомеризации или нежелательного остатка цистеина. N-связанное гликозилирование происходит путем

присоединения олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме Pro. Удаление сайта N-гликозилирования может быть достигнуто путем мутации либо остатка Asn, либо остатка Ser/Thr на другой остаток, в частности, путем консервативной замены. Дезамидирование остатков аспарагина и глутамин может происходить в зависимости от таких факторов, как значение pH и воздействие на поверхность. Остатки аспарагина особенно чувствительны к дезамидированию, прежде всего, когда они присутствуют в последовательности Asn-Gly и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ser. Поэтому, когда такой сайт дезамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в последовательности CDR, может быть желательно удалить этот сайт, обычно путем консервативной замены для удаления одного из задействованных остатков. Предполагается, что замена в последовательности CDR для удаления одного из задействованных остатков также включена в настоящее изобретение.

Термин «Fab» относится в контексте настоящего изобретения к фрагменту антитела, имеющему молекулярную массу приблизительно 50000 Дальтон и антигенсвязывающую активность, в котором приблизительно половина N-концевой стороны тяжелой цепи и вся легкая цепь, среди фрагментов, полученных обработкой IgG протеазой, например, папаином, связаны между собой дисульфидной связью.

Термин «биспецифическая молекула» в контексте настоящего изобретения относится к антигенсвязывающему полипептиду, имеющему по меньшей мере две валентности и специфичности связывания для двух разных антигенов и, таким образом, содержащему два сайта связывания антигена. Термин «валентность» относится к числу сайтов связывания антигенсвязывающего полипептида, например, двухвалентный антигенсвязывающий полипептид относится к антигенсвязывающему полипептиду, который имеет два антигенсвязывающих сайта. Термин «валентность» относится к количеству сайтов связывания, которые могут связываться с одной и той же или с разными мишенями. Бивалентный антигенсвязывающий полипептид может быть моноспецифичным, т.е. может связываться с одной мишенью, или биспецифичным, т.е. может связываться с двумя разными мишенями. Мишенью могут быть антигены, включая их соответствующие эпитопы, пептиды-мишени, нецелевые пептиды, такие как подобные пептиды, или комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$.

В контексте термина «биспецифический» в контексте настоящего изобретения предпочтительно по меньшей мере одна специфичность сайтов связывания антигена происходит из антитела, более конкретно, по меньшей мере один сайт связывания антигена

содержит CDR, полученные из антитела, как описано в настоящем документе. Соответственно, «биспецифический» в контексте настоящего изобретения относится к антигенсвязывающему полипептиду, который объединяет по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт, содержащий CDR, как определено в контексте настоящего изобретения, предпочтительно CDR, полученные из антитела, и по меньшей мере один дополнительный (второй) сайт связывания антигена, при этом указанный по меньшей мере один дополнительный сайт связывания антигена может происходить из антитела и, таким образом, содержать CDR антитела, или может происходить из TCR и, таким образом, содержит CDR TCR. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанный дополнительный (второй) антигенсвязывающий сайт происходит из TCR и, таким образом, содержит CDR TCR.

Термин «формат» относится в контексте настоящего изобретения к антигенсвязывающим полипептидам, содержащим определенное количество и тип доменов, которые присутствуют в указанном антигенсвязывающем полипептиде, и к их пространственной организации. В данной области техники описано множество различных форматов, таких как биспецифические форматы. Такие форматы включают неограничивающие примеры диател, полипептидов с перекрестным двойным переменным доменом (CODV) и/или полипептидов с двойным переменным доменом (DVD). Антигенсвязывающий полипептид может представлять собой диантитело, полипептид с перекрестным двойным переменным доменом (CODV) и/или полипептид с двойным переменным доменом (DVD), который содержит аминокислотные остатки согласно настоящему изобретению в положениях, определенных в формуле изобретения.

Термин «диатела (Db)» относится в контексте антител и в контексте настоящего изобретения обычно к двухвалентным молекулам, состоящим из двух цепей, каждая из которых содержит домен VH и VL, либо из одного и того же, либо из разных антител. Две цепи обычно имеют конфигурацию VHA-VLB и VHB-VLA (A и B представляют две разные специфичности) или VLA-VHB и VLB-VHA.

В контексте настоящего изобретения «диатела (Db)» или «формат диантитела» в настоящем документе относятся к двухвалентным молекулам, состоящим из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит два переменных домена, соединенных линкером (L_{Db1} и L_{Db2}), где два из доменов представляют собой первый и второй домены, как определено в контексте настоящего изобретения (V_1 и V_2), а два других домена могут быть переменными доменами, полученными из TCR или антител (V_A , V_B). Домены V_1 и V_2 расположены на двух разных полипептидах, а домены V_A и V_B расположены на двух разных полипептидах, и домены димеризуются в ориентации «голова к хвосту».

Соответственно ориентация может быть $V_1-L_{Db1}-V_A$ и $V_B-L_{Db2}-V_2$, $V_2-L_{Db1}-V_A$ и $V_B-L_{Db2}-V_1$, $V_1-L_{Db1}-V_B$ и $V_A-L_{Db2}-V_2$ или $V_2-L_{Db1}-V_B$ и $V_A-L_{Db2}-V_1$. Для того, чтобы домены могли димеризовать линкер «голова к хвосту», т.е. L_{Db1} и L_{Db1} могут быть одинаковыми или разными и являются короткими линкерами. Короткий линкер представляет собой линкер, длина которого обычно составляет от 2 до 12, от 3 до 13, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 аминокислот, например, 4, 5 (Brinkmann U. и Kontermann R.E., MAbs. 2017 Feb-Mar, 9(2): 182–212) или 8 аминокислот.

Формат «иммуноглобулина с двумя переменными доменами (DVD-IgTM)» был первоначально описан в 2007 году Wu C. *et al.* (Nat Biotechnol. 2007 Nov, 25(11):1290-7). В этом формате переменные домены второго моноклонального антитела (B), связывающиеся с мишенью, обычно сливаются с обычным антителом (A) (содержащим домены V_{LA} и V_{HA}), где легкая цепь обычного антитела (A), таким образом, содержит дополнительный переменный домен легкой цепи (V_{LB}), а тяжелая цепь обычного антитела (A) содержит дополнительный переменный домен тяжелой цепи (V_{HB}). DVD-IgTM, как описано в данной области техники, таким образом, обычно состоит из двух полипептидных цепей, одной тяжелой цепи, содержащей $V_{HB}-L-V_{HA}-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и одной легкой цепи, содержащей $V_{LB}-L-V_{LA}-C_L$. Пары доменов V_{LA}/V_{HA} и V_{LB}/V_{HB} , таким образом, спариваются параллельно.

В контексте настоящего изобретения «формат Ig с двумя переменными доменами» относится к полипептиду, содержащему две полипептидные цепи, каждая из которых содержит два переменных домена, соединенных линкером (L_1, L_3), причем два из доменов представляют собой первый и второй домены, определенные в контексте настоящего изобретения (V_1 и V_2), а два других домена представляют собой переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела (V_{HA} и V_{HB}). В формате DVD-Ig в контексте настоящего изобретения полипептидные цепи имеют, например, организацию $V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ и $V_2-L_3-V_{LA}-L_4-C_L$ или $V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ и $V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L$. Соединительные линкеры L_1 и L_3 предпочтительно имеют длину от 5 до 20 аминокислотных остатков, например, от 5 до 15 аминокислотных остатков, и/или соединительные линкеры L_2 и L_4 могут присутствовать или отсутствовать.

«Ig-подобные белки с двумя переменными доменами области кроссинговера», известные в данной области техники в контексте антител, описывают формат, в котором два домена V_H и два домена V_L связаны таким образом, который обеспечивает перекрестное спаривание переменных доменов V_H-V_L , которые располагаются либо (от N- к C-концу) в порядке $V_{HA}-V_{HB}$ и $V_{LB}-V_{LA}$ или в порядке $V_{HB}-V_{HA}$ и $V_{LA}-V_{LB}$.

В контексте настоящего изобретения «Ig-подобный белок с двумя переменными доменами области кроссинговера» относится к белку, содержащему две полипептидные цепи, каждая из которых содержит два переменных домена, соединенных линкером (L_1 , L_2 , L_3 и L_4), где два домена представляют собой первый и второй домены, определенные в контексте настоящего изобретения (V_1 и V_2), а два других домена представляют собой переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела (V_{HA} , V_{HB}). В формате CDVD-Ig в контексте настоящего изобретения полипептидные цепи имеют, например, организацию $V_1-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_{LA}-L_3-V_2-L_4-C_L$, $V_2-L_1-V_{HA}-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_{LA}-L_3-V_1-L_4-C_L$, $V_{HA}-L_1-V_1-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, и $V_2-L_3-V_{LA}-L_{DVD3}-C_L$ или $V_{HA}-L_1-V_2-L_2-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ и $V_1-L_3-V_{LA}-L_4-C_L$. В этом формате CDVD линкеры ($L_1 - L_4$) обычно имеют разную длину. Например, L_1 имеет длину от 3 до 12 аминокислотных остатков, L_2 имеет длину от 3 до 14 аминокислотных остатков, L_3 имеет длину от 1 до 8 аминокислотных остатков, и L_4 имеет длину от 1 до 3 аминокислотных остатков, или L_1 имеет длину от 5 до 10 аминокислотных остатков, L_2 имеет длину от 5 до 8 аминокислотных остатков, L_3 имеет длину от 1 до 5 аминокислотных остатков, и L_4 имеет длину от 1 до 2 аминокислотных остатков, или L_1 составляет 7 аминокислотных остатков в длину, L_2 составляет 5 аминокислотных остатков в длину, L_3 составляет 1 аминокислотный остаток в длину, и L_4 составляет 2 аминокислотных остатка в длину.

Термин «ковалентно связанный» или «ковалентная связь» относится в контексте настоящего изобретения, например, к дисульфидному мостику или дисульфидной связи, или пептидной связи, или ковалентной связи через линкер или линкерную последовательность, такую как полипептидный линкер.

Термин «линкер» или «пептидный линкер» относится в контексте настоящего изобретения к «аминокислотной последовательности, которая стерически разделяет две части или фрагменты комплекса, например, два пептида, полипептида или белка. Обычно такой линкер содержит или состоит из от одной до 20 аминокислот. Пептидный линкер обеспечивает гибкость между двумя фрагментами, которые связаны друг с другом. Гибкость обычно увеличивается, если аминокислоты небольшие. Соответственно, гибкие пептидные линкеры содержат повышенное содержание небольших аминокислот, в частности глицина и/или аланина, и/или гидрофильных аминокислот, таких как серин, треонин, аспарагин и глутамины. В контексте настоящего изобретения пептидные линкеры, например, один или несколько аминокислотных остатков, вставленные между двумя доменами, обеспечивают достаточную подвижность доменов, например, в одноцепочечных конструкциях или между переменными доменами переменных доменов легкой и тяжелой цепи. и обеспечивают правильное сворачивание с образованием

сайта связывания антигена. В случае биспецифического антигенсвязывающего полипептида линкер позволяет сформировать сайт связывания антигена и дополнительный сайт связывания антигена либо в форме перекрестного спаривания (в формате CODV или в некоторых форматах диантител), либо в конфигурации параллельного спаривания (например, в формате DVD) антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению. Линкер в контексте настоящего изобретения сокращенно обозначается как L₁, L₂, L₃, L₄ и т.д.

Термин «домены димеризации» (также сокращенно D₁ или D₂, соответственно) в контексте настоящего изобретения предпочтительно относится к доменам гетеродимеризации, которые опосредуют гетеродимеризацию первой полипептидной цепи со второй полипептидной цепью, но не гомодимеризацию двух первых полипептидных цепей или двух вторых полипептидных цепей. Согласно предпочтительным вариантам осуществления пара доменов димеризации (например, D₁ и D₂) содержит константные домены иммуноглобулина, такие как полученные из антител C_L и C_{H1}, или C_L-F_c и C_{H1}-F_c, или полученные из TCR C_α и C_β, или пару доменов C_{H3}, или пару доменов F_c, где домены C_{H3} и F_c предпочтительно содержат введенные мутации, которые вызывают гетеродимеризацию, такие как мутации типа «выступ во впадину». В частности, домены димеризации относятся к доменам F_c, как определено ниже.

В контексте настоящего изобретения термин «домен F_c» охватывает нативные домены F_c и варианты и последовательности домена F_c, как дополнительно определено в настоящем документе ниже. В контексте вариантов F_c и нативных молекул F_c термин «домен F_c» включает молекулы в мономерной или мультимерной форме, расщепленные из цельных антител или полученные другими способами.

В контексте настоящего изобретения термин «нативный F_c» относится к молекуле, содержащей последовательность неантигенсвязывающего фрагмента, полученного в результате расщепления антитела или полученного другими способами, как в мономерной, так и в мультимерной форме, и может содержать шарнирную область. Исходный источник иммуноглобулинов нативного F_c имеет, в частности, человеческое происхождение и может представлять собой любой из иммуноглобулинов, предпочтительно IgG1 или IgG2, наиболее предпочтительно IgG1. Молекулы нативного F_c состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т.е. дисульфидных связей) и нековалентной ассоциации. Число межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул F_c находится в диапазоне от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Одним из примеров

нативного Fc является димер с дисульфидными связями, образующийся в результате расщепления IgG папаином. Термин «нативный Fc» является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм. Предпочтительно домен Fc содержит или дополнительно содержит мутацию «RF» и/или «выступ во впадину», предпочтительно «выступ во впадину». «Мутация RF» обычно относится к аминокислотным заменам аминокислот НУ на RF в домене СНЗ доменов Fc, как например, замена аминокислот Н435R и Y436F в домене СНЗ, описанная в Jendeborg, L. *et al.* (1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34) и описанная как полезная для целей очистки, поскольку устраняет связывание с белком А. В случае, если биспецифический антигенсвязывающий полипептид содержит два домена Fc, RF-мутация может находиться в одном или обоих, предпочтительно в одном, доменах Fc. Технология «выступ во впадину» или также называемая «Knob-in-Hole» относится к аминокислотным заменам T366S, L368A и Y407V (впадина) и T366W (выступ) на границе раздела СНЗ-СНЗ для содействия образованию гетеромультимера. Эту мутацию «выступ во впадину» можно дополнительно стабилизировать путем введения дополнительных аминокислотных замен цистеина Y349C и S354C. Технология «выступ во впадину» вместе со стабилизирующими аминокислотными заменами цистеина описана в патентах US 5731168 и US 8216805, включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «аминокислота» относится в контексте настоящего изобретения к любой мономерной единице, которая содержит замещенную или незамещенную аминогруппу, замещенную или незамещенную карбоксильную группу и одну или несколько боковых цепей или групп, или аналог любой из этих групп. Примеры боковых цепей включают, например, тиол, селено, сульфонил, алкил, арил, ацил, кето, азидо, гидроксил, гидразин, циано, галоген, гидразид, алкенил, алкинил, простой эфир, борат, боронат, фосфо, фосфоно, фосфин, гетероцикл, енон, имин, альдегид, сложный эфир, тиокислота, гидроксилламин или любая комбинация этих групп. Другие репрезентативные аминокислоты включают без ограничения аминокислоты, содержащие фотоактивируемые сшивающие агенты, металлсвязывающие аминокислоты, аминокислоты со спин-мечеными аминокислотами, флуоресцентные аминокислоты, металлсодержащие аминокислоты, аминокислоты с новыми функциональными группами, аминокислоты, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами, фотоэкранированные и/или фотоизомеризуемые аминокислоты, радиоактивные аминокислоты, аминокислоты, содержащие биотин или аналог биотина, гликозилированные аминокислоты, другие модифицированные углеводами аминокислоты, аминокислоты, содержащие полиэтиленгликоль или простой полиэфир, замещенные тяжелым атомом аминокислоты, химически расщепляемые и/или фоторасщепляемые аминокислоты, связанные с углеродом

сахаросодержащие аминокислоты, окислительно-восстановительные аминокислоты, аминокислоты, содержащие аминотиокислоты, и аминокислоты, содержащие один или более токсичных фрагментов. В контексте настоящего изобретения термин «аминокислота» включает следующие двадцать природных или генетически кодируемых альфа-аминокислот: аланин (Ala или A), аргинин (Arg или R), аспарагин (Asn или N), аспарагиновая кислота (Asp или D), цистеин (Cys или C), глутамин (Gln или Q), глутаминовая кислота (Glu или E), глицин (Gly или G), гистидин (His или H), изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), лизин (Lys или K), метионин (Met или M), фенилаланин (Phe или F), пролин (Pro или P), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), триптофан (Trp или W), тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V). В случаях, когда остатки «X» не определены, их следует интерпретировать как «любая аминокислота». Структуры этих двадцати природных аминокислот показаны, например, в Stryer *et al.*, *Biochemistry*, 5th ed., Freeman and Company (2002). Дополнительные аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин, также могут быть генетически закодированы (Stadtman (1996) “Selenocysteine,” *Annu Rev Biochem.* 65:83-100 and Ibba *et al.* (2002) “Genetic code: introducing pyrrolysine,” *Curr Biol.* 12(13):R464-R466). Термин «аминокислота» также включает неприродные аминокислоты, модифицированные аминокислоты (например, имеющие модифицированные боковые цепи и/или основные цепи) и аналоги аминокислот (см., например, Zhang *et al.* (2004) “Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(24):8882-8887, Anderson *et al.* (2004) “An expanded genetic code with a functional quadruplet codon” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(20):7566-7571, Ikeda *et al.* (2003) “Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein *in vivo*,” *Protein Eng. Des. Sel.* 16(9):699-706, Chin *et al.* (2003) “An Expanded Eukaryotic Genetic Code,” *Science* 301(5635):964-967, James *et al.* (2001) “Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues,” *Protein Eng. Des. Sel.* 14(12):983-991, Kohrer *et al.* (2001) “Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(25):14310-14315, Bacher *et al.* (2001) “Selection and Characterization of *Escherichia coli* Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue,” *J. Bacteriol.* 183(18):5414-5425, Hamano-Takaku *et al.* (2000) “A Mutant *Escherichia coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine,” *J. Biol. Chem.* 275(51):40324-40328, and Budisa *et al.* (2001) “Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl) alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids,” *Protein Sci.* 10(7):1281-1292). Аминокислоты могут быть объединены в пептиды, полипептиды или белки.

Аминокислоты можно разделить на полярные и неполярные аминокислоты. Полярность определяется как разделение электрического заряда, приводящее к тому, что молекула или ее химические группы имеют электрический дипольный момент с отрицательно и положительно заряженным концом. Полярные молекулы взаимодействуют посредством диполь-дипольных межмолекулярных сил и водородных связей. Полярность лежит в основе ряда физических свойств, включая поверхностное натяжение, растворимость, температуры плавления и кипения. Полярные аминокислоты включают аминокислоты с донорными и/или акцепторными атомами водорода, за исключением триптофана. Действительно, триптофан, несмотря на его донорный атом водорода, был отнесен к «неполярному» классу IMGT, поскольку он участвует в неполярном ядре структурных доменов. В группу полярных аминокислот входят пять заряженных (R, H, K, D, E) и пять незаряженных (N, Q, S, T, Y) аминокислот. В группу неполярных аминокислот входят незаряженные аминокислоты, такие как аминокислоты (A, C, G, I, L, M, F, P, W, V). Полярные аминокислоты бывают гидрофильными (Q, N) или нейтральными (S, T, Y), обычно находятся снаружи белков и часто образуют водородные связи. Неполярные аминокислоты имеют тенденцию группировать свои боковые цепи внутри белков и часто участвуют во взаимодействиях Ван-дер-Ваальса.

Термин «положительно заряженная аминокислота» относится в контексте настоящего изобретения к аминокислоте, боковая цепь которой несет положительный заряд. Например, при pH 7 лизин (K) и аргинин (R) заряжены положительно. Следовательно, положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой R или K. H также может быть заряжена при pH 7 при определенных условиях. Термин «отрицательно заряженная» относится к аминокислоте, боковая цепь которой несет отрицательный заряд. Например, при pH 7 аспарагиновая кислота (D) и глутаминовая кислота (E) заряжены отрицательно. Отмечается, что заряд может зависеть от значения pH раствора, в котором содержится аминокислота, пептид или белок, а также от температуры. В частности, значение pH и температура человеческого тела имеют значение, если антигенсвязывающие полипептиды настоящего изобретения применяются в качестве лекарственного средства. Соответственно, термин «положительно заряженная аминокислота» относится к аминокислоте, которая несет положительный заряд в условиях, обнаруженных в кровообращении и внеклеточном пространстве субъекта, в частности, в опухолевой ткани субъекта, которому вводят антигенсвязывающий полипептид. Предпочтительно субъектом является человек. В этом случае аминокислота несет положительный заряд, например, при pH и температуре человеческого тела. В конкретных аспектах положительно заряженная аминокислота выбрана из группы, состоящей из

аргинина (R), гистидина (H) и лизина (K), предпочтительно, где положительно заряженная аминокислота представляет собой R или K. В контексте настоящего изобретения, по меньшей мере, одна аминокислота в соответствующем положении в CDR или VH, или VL, как определено в настоящем документе ниже, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. Например, положение содержит серин (S) и, таким образом, представляет собой положение с аминокислотой, которая не является положительно заряженной, и содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, например, R. Остаток S, таким образом, не представляет собой положительно заряженную аминокислоту. Остаток определенного CDR или определенного VH или VL, как определено в настоящем документе ниже, не представляющий собой положительно заряженную аминокислоту, может либо не иметь заряда или представлять собой незаряженную аминокислоту, либо представлять собой отрицательно заряженный аминокислотный остаток. В этом контексте предпочтительно, если Q естественным образом встречается в определенном положении в HCDR2, он предпочтительно не заменен положительно заряженной аминокислотой в контексте настоящего изобретения.

В контексте настоящего изобретения термин «замещенный» относится к замене аминокислоты в родительском антигенсвязывающем полипептиде другой аминокислотой, которая отличается от заменяемой аминокислоты.

Термин «пептид» относится в контексте настоящего изобретения к короткому полимеру аминокислот, связанных пептидными связями. Он имеет те же химические (пептидные) связи, что и белки, но обычно короче по длине. Самым коротким пептидом является дипептид, состоящий из двух аминокислот, соединенных одной пептидной связью. Также может быть трипептид, тетрапептид, пентапептид и т.д. Обычно пептид имеет длину до 8, 10, 12, 15, 18 или 20 аминокислот. Пептид имеет аминоконец и карбоксильный конец, если только он не является циклическим пептидом или химически модифицированным.

Термин «идентичность аминокислотной последовательности» относится в контексте настоящего изобретения к проценту идентичности последовательностей и определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, при этом часть последовательности в окне сравнения может содержать дополнения или делеции (т.е. гэпы) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент вычисляют путем определения количества положений, в которых одинаковое основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, путем деления

количества совпадающих положений на общее количество позиций в окне сравнения. и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательности.

Термин «идентичный» относится в контексте двух или более полипептидов или последовательностей нуклеиновых кислот к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми, т.е. содержат одну и ту же последовательность аминокислот или нуклеиновых кислот. Последовательности являются «по существу идентичными» друг другу, если они имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков (например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности в указанной области), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия по окну сравнения или обозначенной области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем ручного выравнивания и визуального контроля. Эти определения также относятся к комплементу тестовой последовательности. Соответственно, термин «по меньшей мере 80% идентичности последовательностей» используется во всем описании в отношении сравнений полипептидных и полинуклеотидных последовательностей. Это выражение предпочтительно относится к идентичности последовательностей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% по отношению к соответствующему эталонному полипептиду или соответствующему эталонному полинуклеотиду.

Термин «сравнение последовательностей» относится в контексте настоящего изобретения к процессу, в котором одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравниваются тестовые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводятся тестовые и эталонные последовательности, при необходимости назначают координаты подпоследовательностей и обозначают параметры программы алгоритма последовательности. Обычно используют параметры программы по умолчанию или могут

быть назначены альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности или сходства последовательностей тестовых последовательностей относительно эталонной последовательности на основе параметров программы. В случае, когда сравнивают две последовательности и не указана эталонная последовательность, в сравнении с которой рассчитывается процент идентичности последовательностей, идентичность последовательности должна рассчитываться со ссылкой на более длинную из двух сравниваемых последовательностей, если не указано иное. Если указана эталонная последовательность, идентичность последовательности определяется на основе полной длины эталонной последовательности, указанной ее идентификационным номером SEQ, если специально не указано иное.

Методы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана (Adv. Appl. Math. 2:482, 1970), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), методом поиска сходства Пирсона и Липмана (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988), путем компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), или путем ручного выравнивания и визуального осмотра (см., например, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)). Алгоритмами, подходящими для определения процента идентичности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.* (Nuc. Acids Res. 25:3389-402, 1977), and Altschul *et al.* (J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990), соответственно. Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем идентификации коротких слов длины W в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому баллу T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. T называется порогом оценки слов соседства (Altschul *et al.*, см. выше). Эти начальные совпадения слов из соседства действуют как затравки для начала поиска по поиску более длинных HSP, содержащих их. Совпадающие слова расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может быть увеличен совокупный показатель выравнивания. Совокупные баллы рассчитывают с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров M (оценка вознаграждения за пару совпадающих

остатков, всегда >0) и N (оценка штрафа за несовпадающие остатки, всегда <0). Для аминокислотных последовательностей для расчета совокупного балла используется оценочная матрица. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращается, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от максимального достигнутого значения, совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательным баллом, или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию использует длину слова (W), равную 11, математическое ожидание (E) или 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP по умолчанию использует длину слова 3, математическое ожидание (E) 10 и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989) выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей.

Другой мерой сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является вероятность наименьшей суммы ($P(N)$), которая указывает на вероятность того, что совпадение между аминокислотными последовательностями произойдет случайно. Например, аминокислота считается похожей на эталонную последовательность, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой аминокислоты с эталонной аминокислотой составляет менее приблизительно 0,2, обычно менее приблизительно 0,01 и чаще менее приблизительно 0,001. Предпочтительны полуконсервативные и особенно консервативные аминокислотные замены, при которых аминокислота заменена химически родственной аминокислотой. Типичные замены находятся среди алифатических аминокислот, среди аминокислот, имеющих алифатическую гидроксильную боковую цепь, среди аминокислот, имеющих кислотные остатки, среди амидных производных, среди аминокислот с основными остатками или среди аминокислот, имеющих ароматические остатки. Типичные полуконсервативные и консервативные замены указаны в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Аминокислоты и консервативные и полуконсервативные замены, соответственно.

Аминокислота	Консервативная замена	Полуконсервативная замена
A	G, S, TN, V, C	
C	A, V, L	M, I, F, G
D	E, N, Q	A, S, T, K, R, H

E	D, Q, N	A, S, T, K, R,
F	W, Y, L, M, H	I, V, A
G	A	S, N, T, D, E, N, Q
H	Y, F, K, R	L, M, A
I	V, L, M, A	F, Y, W, G
K	R, H	D, E, N, Q, S, T, A
L	M, I, V, A	F, Y, W, H, C
M	L, I, V, A	F, Y, W, C,
N	Q	D, E, S, T, A, G, K, R
P	V, I	L, A, M, W, Y, S, T, C, F
Q	N	D, E, A, S, T, L, M, K, R
R	K, H	N, Q, S, T, D, E, A
S	A, T, G, N	D, E, R, K
T	A, S, G, N, V D, E, R, K, I	
V	A, L, I M, T, C, N	
W	F, Y, H	L, M, I, V, C
Y	F, W, H	L, M, I, V, C

Изменение A, F, H, I, L, M, P, V, W или Y на C является полуконсервативным, если новый цистеин остается в виде свободного тиола. Кроме того, специалисту в данной области техники понятно, что глицины в стерически сложных положениях не следует заменять, и что P не следует вводить в части белка, которые имеют структуру альфа-спирали или бета-листа.

Термин «функциональный вариант» или «вариант», используемый в контексте настоящего изобретения, относится к антигенсвязывающему полипептиду или полипептиду согласно настоящему изобретению, имеющим существенную или значительную идентичность или сходство последовательности с данным антигенсвязывающим полипептидом или полипептидом, где указанный функциональный вариант сохраняет биологическую активность данного антигенсвязывающего полипептида или полипептида. В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающие полипептиды, содержащие замены согласно настоящему изобретению, в частности соответствующие положительно заряженные аминокислоты и/или Y в положении 90, как определено в настоящем документе выше и ниже, приводят к улучшенному или усиленному связыванию (например, EC 50 связывания) и/или к улучшению или увеличению T_m по сравнению с

исходным антигенсвязывающим полипептидом или эталонным антигенсвязывающим полипептидом. Таким образом, предполагается, что функциональные варианты антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению имеют такое же или улучшенное и повышенное, соответственно, связывание (например, EC 50 связывания) или T_m , что и антигенсвязывающий полипептид, с которым их сравнивают. Кроме того, это также предусмотрено для частей, областей или фрагментов антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению, таких как FR, или VH, или VL. Представленные в настоящем документе функциональные варианты, например, FR, VH, VL, или антигенсвязывающие полипептиды, как определено в настоящем документе, могут иметь аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % или 99% идентична аминокислотной последовательности данного антигенсвязывающего полипептида, например, антигенсвязывающего полипептида. Согласно некоторым вариантам осуществления функциональный фрагмент содержит замены согласно настоящему изобретению. Предпочтительно функциональный фрагмент имеет улучшенное или повышенное связывание (например, EC50 связывания) и/или T_m по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или его фрагментом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению.

«Функциональный вариант», как определено в настоящем документе, может, например, содержать аминокислотную последовательность соответствующего антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность соответствующего антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению по меньшей мере с одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно неконсервативная аминокислотная замена не мешает и не ингибирует биологическую активность функционального варианта. Предпочтительно неконсервативная аминокислотная замена усиливает биологическую активность функционального варианта, так что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с соответствующим антигенсвязывающим полипептидом или его фрагментом.

Термин «стабильность» относится в контексте настоящего изобретения к термической стабильности белков, полипептидов или антигенсвязывающих полипептидов. Белки или полипептиды обычно характеризуются, среди прочего, термостойкостью или термической стабильностью, описываемой параметром «температура плавления (T_m)». Температура является фактором, обеспечивающим функциональные и правильно

свернутые белки. Таким образом, стабильность белков варьируется в зависимости от применяемых температурных условий. При температуре выше нативной температуры белка тепловая энергия приведет к разворачиванию и денатурации указанного белка. Если белок устойчив к необратимым изменениям при высоких температурах, его называют термостабильным или термически стабильным. Как упоминалось выше, термическая стабильность определяется дескрипторной температурой плавления T_m .

Термин «температура плавления (T_m)» в контексте настоящего изобретения относится к «термической стабильности», температуре, при которой концентрация белка в свернутом состоянии равна концентрации развернутого белка (Miotto *et al.*, Insights о термостабильности белков: графическое представление молекулярных взаимодействий, препринт bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/354266>, 22 июня 2018 г.). В частности, T_m представляет собой температуру, при которой 50% белка разворачивается, как показано ниже в примерах. Если полипептиды или белки достигают своей T_m , изменение свободной энергии ΔG равно нулю. В этот момент молекулы полипептида или белка переходят в аморфное состояние, и цепи белков не могут повторно сворачиваться. Общее практическое правило состоит в том, что увеличение T_m связано с увеличением свободной энергии максимальной стабильности дельта $G(T^*)$. T_m можно измерить с помощью кругового дихроизма (CD) — спектроскопического метода отслеживания разворачивания и сворачивания белков в зависимости от температуры или с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF) или биохимических анализов. Как правило, белки или полипептиды с высокими значениями T_m более стабильны, чем белки или полипептиды с более низкими значениями T_m . Увеличение термической стабильности приводит к уменьшению денатурации антигенсвязывающих полипептидов и, таким образом, например, к улучшению условий хранения указанных полипептидов. Нанодифференциальная сканирующая флуориметрия (нано-DSF) в качестве типового метода раскрыта в настоящем документе ниже в прилагаемых примерах для определения T_m с использованием буфера PBS (фосфатно-солевой буфер) при pH 7,4. Предпочтительно T_m определяют с помощью DSF, более предпочтительно с помощью nanoDSF. В частности, T_m определяют с помощью DSF в PBS, pH 7,4, со скоростью нагревания 1°C/мин, при этом антигенсвязывающий полипептид имеет концентрацию 50 мкг/мл. Абсолютные температуры плавления могут быть получены напрямую. Можно рассчитать значения дельта T_m для различных аналитов. Предпочтительно значения, которые сравнивают друг с другом, получены в одном и том же экспериментальном цикле.

Термин «связывание» относится в контексте настоящего изобретения к «аффинности связывания» или «площади под кривой связывания (AUC)» или «значению EC50 связывания», как более подробно определено ниже. В частности, «связывание» относится к связыванию антигенсвязывающего полипептида с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, как определено выше, или предпочтительно к связыванию антигенсвязывающего полипептида с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, или более предпочтительно Т-клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Связывание антигенсвязывающего полипептида можно определить с помощью анализа проточной цитометрии, как в настоящем документе дополнительно раскрыто ниже в примерах, например, с помощью FACS, где определяют связывание антигенсвязывающего полипептида с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительной клеткой, например, в сравнение с родительским антигенсвязывающим полипептидом, в частности с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению, например, ВМА031 (V36). Предпочтительно связывание антигенсвязывающего полипептида с клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, определяют с помощью анализа связывания проточной цитометрией с использованием TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительных клеток Jurkat (например, клеток клона Е6-1) и TCR α/β -отрицательных клеток Jurkat. В частности, связывание антигенсвязывающего полипептида определяют путем тестирования различных концентраций антигенсвязывающего полипептида, например, от 10 мкг/мл до 10 нг/мл с полулогарифмическим шагом. Согласно дополнительным конкретным аспектам связывание с клетками и стадии промывки осуществляют в буфере, содержащем PBS, 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 5% фетальной телячьей сыворотки (FCS). Согласно дополнительным конкретным аспектам антиген-отрицательные клетки (например, меченные CFSE CellTrace) смешивают с антиген-положительными клетками в соотношении 1:1. Согласно дополнительным конкретным аспектам концентрации антигенсвязывающего полипептида (например, 100 мкл/лунка) инкубируют со смесью клеток (например, 100000 клеток/лунка) в течение, например, 15 минут на льду в указанном буфере, и клетки промывают для удаления несвязанного антигенсвязывающего полипептида. Предпочтительно проводят сортировку/окрашивание живых/мертвых клеток. Окрашивание клеток, связанных с антигенсвязывающим полипептидом, можно определить с помощью проточного цитометра (например, Intellicyt iQue Screener (Sartorius AG) или CytoFLEX (Beckmann Coulter, 2089495-01)) и сравнить значения MFI (средняя интенсивность флуоресценции).

«Аффинность связывания» или «аффинность» в контексте настоящего изобретения может быть выражена, например, посредством полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) или равновесной константы диссоциации (K_D).

«Полумаксимальная эффективная концентрация», также сокращенно называемая « EC_{50} » или « $EC50$ », относится в контексте настоящего изобретения к « $EC50$ связывания» или «функциональной $EC50$ » и указывается, соответственно, во всей заявке, какой бы термин ни использовался.

Термин « $EC50$ связывания» в контексте настоящего изобретения может быть описан как концентрация лиганда, например, антигенсвязывающего полипептида или белка, при которой половина мишени t , например комплекса TCR $\alpha/\beta/CD3$, находится в связанном состоянии. $EC50$ связывания представляет собой параметр для измерения связывания антигенсвязывающего полипептида с клетками-мишенями, предпочтительно Т-клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, т.е. связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению с их мишенью. Значение $EC50$ связывания зависит от целевой концентрации. $EC50$ и аффинность обратно пропорциональны, что означает, что чем ниже значение $EC50$, тем выше аффинность связывания молекулы. Обычно предпочтительными являются низкие значения $EC50$. Значения $EC50$ связывания, например, определяют с помощью анализа связывания проточной цитометрией, как описано в приведенных ниже примерах, с использованием проточного цитометра (например, Intellicyt iQue Screener (Sartorius AG) или CytoFLEX (Beckmann Coulter, 2089495-01). Обычно измерения проводят под следующие условия: меченые клетки (например, клетки, не экспрессирующие комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$ целевого антигена, меченные CFSE CellTrace) смешивают с антиген-положительными клетками в соотношении 1:1. Согласно дополнительным конкретным аспектам антигенсвязывающий полипептид (например, концентрация 100 мкл/лунка) инкубируют со смесью клеток (например, 100000 клеток/лунка) в течение, например, 15 мин на льду в указанном буфере, и клетки промывают для удаления несвязанного антигенсвязывающего полипептида. Окрашивание можно определить в проточном цитометре, и значения MFI различных образцов моно сравнить. Предпочтительно значение $EC50$ MFI антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению рассчитывают и представляют как x -кратное уменьшение по сравнению со значением $EC50$ MFI родительского антитела ВМА031 (V36), также обозначаемого TPP-1374, не содержащего аминокислотных замен согласно настоящему изобретению. Например, TPP-1389 демонстрирует кратное снижение $EC50$ на 31,8, что означает, что $EC50$ снижается в 31,8 раза по сравнению с $EC50$, определенным идентичным методом для родительского антитела TPP-1374. Таким образом,

значение EC50 связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению предпочтительно ниже, чем значение EC50 связывания родительского антигенсвязывающего полипептида, например, антигенсвязывающего полипептида, не содержащего замен согласно настоящему изобретению (например, не содержащего замены на положительно заряженную аминокислоту и/или не содержащего тирозин в положении 90). Как указано в настоящем документе ниже, x-кратное уменьшение антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению сравнивают с родительским антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению (например, не содержащим замены на положительно заряженную аминокислоту и/или не содержащим тирозин в положении 90). Предпочтительно x-кратное уменьшение антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению сравнивают с родительским антителом BMA031 (V36), содержащим VH согласно SEQ ID NO: 1 и VL согласно SEQ ID NO: 2.

Термин «функциональная EC50» в контексте настоящего изобретения относится к половине максимальной эффективной концентрации вещества и, таким образом, является мерой концентрации указанного вещества, которая вызывает реакцию на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. Ее обычно используют как меру эффективности лекарственного средства. Таким образом, EC50 ступенчатой кривой зависимости эффекта от дозы представляет собой концентрацию вещества, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. EC₅₀ ступенчатой кривой зависимости эффекта от дозы представляет собой концентрацию соединения, при которой 50% популяции проявляют ответ после определенного времени воздействия. В одном примере «значение функциональной EC50» относится к концентрации антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению, которая индуцирует ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. Значения EC50 можно экспериментально оценить с помощью множества известных методов, используя, например, анализ высвобождения IFN-гамма или анализ высвобождения LDH, как, например, описано в настоящем документе в примере 3.

Термин «площадь под кривой (AUC)» относится в контексте настоящего изобретения к «площади под кривой связывания (AUC связывания)» и используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Как указано выше, связывание также может быть выражено как AUC или AUC связывания, которую рассчитывают на основе логарифмированных концентраций антигенсвязывающего полипептида и MFI. Рассчитанное EC50, или AUC, означает силу

связывания антигенсвязывающего полипептида, например антитела, с его мишенью, например, антигеном, и наоборот, и, следовательно, увеличенные значения AUC указывают на повышенное или улучшенное связывание антигенсвязывающего полипептида, например, антитела, с его мишенью, например, антигеном, и наоборот, и, поэтому, увеличенные значения AUC указывают на повышенное или улучшенное связывание антигенсвязывающего полипептида с его мишенью, или наоборот, например, с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, или предпочтительно клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, или более предпочтительно Т-клетками, экспрессирующими комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Предпочтительно AUC антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению указывается в виде «% увеличения AUC связывания» или «% увеличения AUC», что означает «% увеличения AUC». Термины «% увеличения AUC связывания» или «% увеличения AUC» можно использовать в настоящем документе взаимозаменяемо. AUC связывания антигенсвязывающего полипептида сравнивают с AUC связывания родительского антигенсвязывающего полипептида, в частности, не содержащего замен согласно настоящему изобретению (например, не содержащего замены на положительно заряженную аминокислоту и/или не содержащего тирозин в положении 90). В настоящем документе «% увеличения AUC связывания» или «% увеличения AUC» антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению сравнивают с родительским антигенсвязывающим полипептидом, в частности, не содержащим замены согласно настоящему изобретению (например, не содержащим замены на положительно заряженный аминокислоту и/или не содержащую тирозин в положении 90). Предпочтительно «% увеличения AUC связывания» или «% увеличения AUC» антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению сравнивают с родительским антителом BMA031(V36), также обозначенным TPP-1374 в приведенных ниже примерах, в идентичных условиях (и предпочтительно в одной и той же экспериментальной серии), и где установлено нулевое увеличение AUC. Например, антигенсвязывающий полипептид TPP-1375 показывает увеличение AUC на 87% (см. Таблицу 5 в разделе примеров), что указывает на увеличение AUC связывания на 87% по сравнению с родительским антителом TPP-1374, используемым для сравнения.

Термин «синергический» или синергизм относится в контексте настоящего изобретения к синергическим эффектам, которые возникают вследствие более чем одной различной мутации в CDR или FR варибельного домена (доменов) антигенсвязывающего полипептида. Синергетические эффекты представляют собой нелинейные кумулятивные эффекты, которые превышают простую сумму эффектов, вызванных каждой отдельной мутацией в отдельности. Например, увеличение в процентах AUC антигенсвязывающего

полипептида TPP-1360, несущего R в положении 31 тяжелой цепи, составляет 144%, а для антигенсвязывающего полипептида TPP-1387, несущего Y в положении 90, составляет 14% (см. Таблицу 6 примеров, раскрытых в настоящем документе). Как неожиданно было показано в примерах, антигенсвязывающие полипептиды обеспечивают синергические эффекты. Например, антигенсвязывающий полипептид, содержащий замену в положении 31 на R и замену на Y в положении 90 в тяжелой цепи, как показано в TPP-1388, демонстрирует увеличение AUC 273%, что иллюстрирует синергетический эффект в отношении % увеличения AUC, например, см. Таблицу 5 или 6.

Термин «константа диссоциации (K_D)» (измеренная в «моль/л», иногда сокращенно «M») в контексте настоящего изобретения относится к равновесной константе диссоциации, отношению k_{off}/k_{on} , конкретного взаимодействия между связывающим фрагментом (например, антигенсвязывающим полипептидом или его фрагментом) и молекулой-мишенью (например, антигеном или его эпитопом). K_D и аффинность находятся в обратной зависимости. Значение K_D относится к концентрации антигенсвязывающего полипептида, и чем ниже значение K_D , тем выше аффинность антигенсвязывающего полипептида. Аффинность, то есть значение K_D , можно экспериментально оценить с помощью множества известных методов, таких как измерение скоростей ассоциации и диссоциации с помощью анализов на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (таких как анализ BIAcore) или интерферометрии биослоя (BLI), ферментативного иммуносорбентного анализа (ELISA) и конкурентных анализов (например, радиоиммунные анализы (RIA)). Антигенсвязывающие полипептиды с низкой аффинностью обычно медленно связывают антигены и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как антитела с высокой аффинностью обычно связывают антигены быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными. K_D обычно измеряют при 30°C методами BLI или SPR.

Как правило, если антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению содержит второй сайт связывания, и этот второй сайт связывания, специфично связывающийся с данным антигеном, содержит TCR с созревшей аффинностью или его фрагмент, или антигенсвязывающий полипептид представляет собой растворимую молекулу в биспецифическом формате или ее фрагмент, как например, молекула TCER® или ее фрагмент, K_D TCR или его функционального фрагмента, в частности $V\alpha$ или $V\beta$, находится в диапазоне от 9×10^{-8} до 5×10^{-13} M, от 9×10^{-9} до 1×10^{-12} M, от 8×10^{-9} до 5×10^{-12} M, от 7×10^{-9} до 1×10^{-11} M, от 6×10^{-9} до 2×10^{-11} M, от 5×10^{-9} до 5×10^{-11} M, от 4×10^{-9} до 8×10^{-11} M, от 3×10^{-9} до 1×10^{-10} M. Молекулы в биспецифическом формате, называемые в настоящем документе молекулами «TCER®» или «TCER®», обычно содержат первый антигенсвязывающий сайт, содержащийся в первой полипептидной цепи, которая

специфически связывается с поверхностной молекулой на Т-клетке, и второй антигенсвязывающий сайт, содержащийся во второй полипептидной цепи, которая специфически связывается с комплексом МНС-пептид.

Как правило, если антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий сайт, и этот второй сайт связывания, специфично связывающийся с данным антигеном, содержит TCR или его фрагмент, TCR или его фрагмент имеет K_d в диапазоне от 3×10^{-5} до 1×10^{-7} с⁻¹, от 2×10^{-5} до 5×10^{-7} с⁻¹, от 1×10^{-5} до 1×10^{-6} с⁻¹ или от 5×10^{-6} до 1×10^{-6} с⁻¹.

Термин «TCER®», также называемый «молекула TCER®», относится в контексте настоящего изобретения к биспецифической молекуле, которая имеет одну специфичность, которая специфически связывается с поверхностной молекулой Т-клетки, и одну специфичность, которая специфически связывается с комплексом МНС - пептид. Таким образом, «TCER®» представляют собой биспецифические TCR, которые представляют собой растворимые антигенсвязывающие полипептиды, содержащие первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, как определено в настоящем документе, причем первый антигенсвязывающий сайт содержит домены VH и VL антигенсвязывающего полипептида, как определено в настоящем документе, специфически связывающегося с комплексом TCR α/β /CD3, и дополнительный или второй антигенсвязывающий сайт, который образован варибельным доменом α ($V\alpha$) и варибельным доменом β ($V\beta$) TCR, специфически связывающимся с комплексом МНС-пептид, например, комплексом опухолеассоциированный пептид-МНС.

Термин «специфически связывающийся» относится в контексте настоящего изобретения к связыванию антигенсвязывающего полипептида или его фрагментов, например, антитела или его фрагмента или TCR или его фрагментов, с сайтом специфического связывания его мишени, когда мишень содержит специфические и неспецифические сайты связывания. Однако иногда связывание полипептида с близкородственными белками неизбежно, тогда фактическое связывание с мишенью может быть специфичным, но антигенсвязывающий полипептид считается неспецифичным по отношению к предполагаемому связыванию с мишенью. Считается, что антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению специфически связывается, если он связывается со своей мишенью сильнее или усиленно, чем с одним или несколькими подобными антигенами. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид представляет собой антитело, которое специфически связывается со своей мишенью.

Термин «белок клеточной поверхности» относится в контексте настоящего изобретения к белкам, которые встроены в слой клеточных мембран более сложных организмов или охватывают его. Эти белки являются неотъемлемой частью взаимодействия клетки с окружающей средой, включая другие клетки. Примерами белков клеточной поверхности являются антигенные рецепторы, такие как антитела или TCR или цепи TCR, антигенпрезентирующие молекулы, такие как молекулы МНС или β -микроглобулин, молекулы-коррецепторы, такие как CD4, CD8 или CD19, вспомогательные молекулы рецептора антигена, такие как CD3 цепи $-\gamma$, $-\delta$ и $-\epsilon$, CD79a и CD79b, костимулирующие или ингибирующие молекулы, такие как CD28, CD80 или CD86, рецепторы естественных клеток-киллеров, рецепторы на лейкоцитах, молекулы иммуноглобулиноподобной клеточной адгезии, такие как ICAM, NCAM, CD2, цитокиновые рецепторы, такие как рецептор IL-1 или рецептор колониестимулирующего фактора 1, рецепторы факторов роста, рецепторные тирозинкиназы или фосфатазы, Ig-связывающие рецепторы, такие как полимерный рецептор иммуноглобулина (PIGR) или Fc-рецепторы. Дополнительными примерами являются молекулы поверхностного маркера, выбранные из группы, состоящей из CD3, CD4, CD25, CTLA4, GITR, NK1.1, SLAMF1, SLAMF6, TGF β , V α 24, J α 18, IL-12R, IFN γ R, CXCR3, IL-4R, IL33R, CCR4, IL-17RB, CRTH2, IL-23R, CCR6, IL-1R, CD161, CCR7 hi, CD44, CD62Lhi, TCR, CD3, IL-7R (CD127), IL-15R.

Термин «МНС» относится в контексте настоящего изобретения к аббревиатуре термина «главный комплекс гистосовместимости». МНС представляют собой набор белков клеточной поверхности, т.е. рецепторов клеточной поверхности, которые играют важную роль в установлении приобретенного иммунитета против измененных природных или чужеродных белков у позвоночных, что, в свою очередь, определяет гистосовместимость внутри ткани. Основная функция молекул МНС состоит в связывании с антигенами, полученными из измененных белков или патогенов, и отображать их на поверхности клетки для распознавания соответствующими Т-клетками. МНС человека также называют комплексом HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) или HLA. Семейство генов МНС разделено на три подгруппы: класс I, класс II и класс III. Комплексы пептида и МНС класса I распознаются CD8-положительными Т-клетками, несущими соответствующий TCR, тогда как комплексы пептида и молекул МНС класса II распознаются CD4-положительными Т-хелперами, несущими соответствующий TCR. Поскольку оба типа ответа, CD8- и CD4-зависимый, совместно и синергически способствуют противоопухолевому эффекту, идентификация и характеристика опухолеассоциированных антигенов и соответствующих TCR важны при разработке способов иммунотерапии рака, таких как вакцины и клеточная терапия.

Термин «МНС-I» относится в контексте настоящего изобретения к молекулам МНС класса I или МНС-I. Молекула МНС I состоит из альфа-цепи, также называемой тяжелой цепью МНС I, и бета-цепи, которая составляет молекулу бета-2-микроглобулина. Альфа-цепь включает три альфа-домена, т.е. домен альфа1, домен альфа2 и домен альфа3. Домен альфа1 и альфа2 в основном способствуют формированию пептидного кармана для образования комплекса пептид-лиганд МНС (pMHC). МНС-I обычно связывает пептиды, которые происходят из цитозольных антигенных белков и которые разрушаются протеасомой после убиквитилирования и впоследствии транспортируются через специфический транспортер, связанный с процессингом антигена (TAP), из цитозоля в эндоплазматический ретикулум (ER). МНС I обычно связывает пептиды длиной 8-12 аминокислот.

Термин «МНС-II» относится в контексте настоящего изобретения к молекулам МНС класса II или МНС-II. Молекула МНС-II состоит из альфа- и бета-цепи, причем альфа-цепь содержит два альфа-домена, домен альфа1, домен альфа2, и бета-цепь включает два бета-домена, бета-домен 1 и бета-домен 2. МНС II обычно складывается в ER в комплекс с белком, называемым инвариантной цепью, и затем транспортируется в поздние эндосомальные компартменты, где инвариантная цепь расщепляется катепсиновыми протеазами и короткий фрагмент остается связанным с пептид-связывающей бороздкой МНС II и называется пептидом инвариантной цепи, ассоциированным с классом II (CLIP). Этот временный пептид затем обычно заменяется на пептиды с более высокой аффинностью, которые происходят из протеолитически деградированных белков, доступных в эндоцитарных компартментах. МНС-II обычно связывает пептиды длиной 10-30 аминокислот или пептиды длиной 13-25 аминокислот.

Термин «HLA» относится в контексте настоящего изобретения к молекулам МНС человека, которые у разных людей различаются аминокислотными последовательностями.

Термин «нуклеиновая кислота» относится в контексте настоящего изобретения к одно- или двухцепочечным олиго- или полимерам дезоксирибонуклеотидных или рибонуклеотидных оснований или и того, и другого. Нуклеотидные мономеры состоят из нуклеинового основания, пятиуглеродного сахара (например, без ограничения рибозы или 2'-дезоксирибозы) и от одной до трех фосфатных групп. Обычно нуклеиновая кислота образуется посредством фосфодиэфирных связей между отдельными нуклеотидными мономерами. В контексте настоящего изобретения термин «нуклеиновая кислота» включает без ограничения молекулы рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), но также включает синтетические формы нуклеиновых кислот, содержащие другие связи (например, пептидные нуклеиновые

кислоты, как описано у Nielsen et al. (Science 254:1497-1500, 1991). Нуклеиновые кислоты, как правило, представляют собой одно- или двухцепочечные молекулы и состоят из встречающихся в природе нуклеотидов. Воспроизведение одноцепочечной нуклеиновой кислоты также определяет (по меньшей мере частично) последовательность комплементарной цепи. Нуклеиновая кислота может быть одно- или двухцепочечной или может содержать части как двухцепочечных, так и одноцепочечных последовательностей. В качестве примера, молекулы двухцепочечной нуклеиновой кислоты могут иметь 3'- или 5'-выступающие части, и поэтому не требуется или не предполагается, что они полностью двухцепочечные по всей своей длине. Нуклеиновая кислота может быть получена методами биологического, биохимического или химического синтеза или любым из методов, известных в данной области техники, включая без ограничения способы амплификации и обратной транскрипции РНК. Термин «нуклеиновая кислота» включает хромосомы или хромосомные сегменты, векторы (например, векторы экспрессии), кассеты экспрессии, голый полимер ДНК или РНК, праймеры, зонды, кДНК, геномную ДНК, рекомбинантную ДНК, кРНК, мРНК, тРНК, микроРНК (миРНК) или малую интерферирующую РНК (миРНК). Нуклеиновая кислота может быть, например, одноцепочечной, двухцепочечной или трехцепочечной и не ограничена какой-либо конкретной длиной. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты содержит или кодирует комплементарные последовательности в дополнение к любой явно указанной последовательности.

Термин «вектор» в контексте настоящего изобретения относится к полинуклеотиду, который кодирует представляющий интерес белок, или к смеси, содержащей полипептид (полипептиды) и полинуклеотид, который кодирует представляющий интерес белок, который можно вводить или может вводить содержащиеся в нем белки и/или нуклеиновые кислоты в клетку. Примеры векторов включают без ограничения плазмиды, космиды, фаги, вирусы или искусственные хромосомы. Вектор используют для введения представляющего интерес генного продукта, такого как, например, чужеродная или гетерологичная ДНК, в клетку-хозяина. Векторы могут содержать «репликонные» полинуклеотидные последовательности, которые облегчают автономную репликацию вектора в клетке-хозяине. Чужеродная ДНК определяется как гетерологичная ДНК, то есть ДНК, не встречающаяся в природе в клетке-хозяине, которая, например, реплицирует векторную молекулу, кодирует селективируемый или скринируемый маркер или кодирует трансген. Попав в клетку-хозяина, вектор может реплицироваться независимо или одновременно с хромосомной ДНК хозяина, и может быть создано несколько копий вектора и вставленной в него ДНК. Кроме того, вектор также может содержать необходимые элементы, которые

обеспечивают транскрипцию вставленной ДНК в молекулу мРНК или иным образом вызывают репликацию вставленной ДНК во множество копий РНК. Векторы могут дополнительно включать «контрольные последовательности экспрессии», которые регулируют экспрессию представляющего интерес гена. Обычно последовательности контроля экспрессии представляют собой полипептиды или полинуклеотиды, такие как промоторы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы или репрессоры. В векторе, содержащем более одного полинуклеотида, кодирующего один или несколько представляющих интерес генных продуктов, экспрессия может контролироваться вместе или по отдельности с помощью одной или нескольких последовательностей контроля экспрессии. Более конкретно, каждый полинуклеотид, содержащийся в векторе, может контролироваться отдельной последовательностью контроля экспрессии, или все полинуклеотиды, содержащиеся в векторе, могут контролироваться одной последовательностью контроля экспрессии. Полинуклеотиды, содержащиеся в одном векторе, контролируемом одной последовательностью контроля экспрессии, могут образовывать открытую рамку считывания. Некоторые векторы экспрессии дополнительно содержат элементы последовательности, прилегающие к вставленной ДНК, которые увеличивают период полужизни экспрессируемой мРНК и/или обеспечивают трансляцию мРНК в белковую молекулу. Таким образом, можно быстро синтезировать многие молекулы мРНК и полипептидов, кодируемых встроенной ДНК. Такие векторы могут содержать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и т.п., чтобы вызывать или направлять экспрессию указанного полипептида при введении субъекту. Примеры промоторов и энхансеров, используемых в векторе экспрессии для клеток животных, включают ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami T. *et al.* 1987), промотор и энхансер LTR вируса мышинного лейкоза Молони (Kuwana Y *et al.* 1987), промотор (Mason JO *et al.*, 1985) и энхансер (Gillies SD *et al.*, 1983) H-цепи иммуноглобулина и т.п. Можно использовать любой вектор экспрессии для клеток животных, при условии, что ген, кодирующий С-область человеческого антитела, может быть вставлен и экспрессирован. Примеры подходящих векторов включают pAGE107 (Miyaji H *et al.* 1990), pAGE103 (Mizukami T *et al.* 1987), pHSG274 (Brady G *et al.* 1984), pKCR (O'Hare K *et al.* 1981), pSG1 beta d2-4-(Miyaji H *et al.* 1990) и т.п. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие точку начала репликации, или интегративные плазмиды, например, pUC, pcDNA, pBR.

Термин «трансформация» относится в контексте настоящего изобретения к естественно происходящему процессу переноса гена в клетку-хозяина, который предусматривает поглощение генетического материала, такого как нуклеиновые кислоты

(ДНК или РНК), клеткой через клеточную мембрану, так что клетка-хозяин будет экспрессировать введенный ген или последовательность с получением желаемого генного продукта, обычно белка или фермента, кодируемого геном или последовательностью, которые вводятся в клетку-хозяина. Существуют два типа трансформации, известные как естественная трансформация и искусственная или индуцированная трансформация. Искусственную или индуцированную трансформацию обычно называют «трансфекцией».

Термин «трансфекция» относится в контексте настоящего изобретения к способу переноса генов, включающему создание пор на клеточной мембране клетки-хозяина, позволяющих клетке-хозяину получать чужеродный генетический материал. Трансфекция относится к трансформации эукариотических клеток, таких как клетки насекомых или млекопитающих. Химически опосредованная трансфекция включает использование, например, фосфата кальция или катионных полимеров или липосом. Нехимическими методами трансфекции обычно являются электропорация, сонопорация, прокалывание, оптическая трансфекция или гидродинамическая доставка. Трансфекция на основе частиц использует метод генной пушки, при котором наночастицы используют для переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, или другой метод, называемый магнитофекцией. Нуклеофекция и использование теплового шока представляют собой другие развитые методы успешной трансфекции. Клетка-хозяин, которая получает чужеродные нуклеиновые кислоты методом трансфекции, является «трансфицированной».

Термин «трансдукция» относится в контексте настоящего изобретения к переносу чужеродных нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, в клетку с помощью вируса или вирусного вектора. Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует чужеродные нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК) «трансдуцирована» вирусом или вирусным вектором.

Термин «фармацевтическая композиция» или «терапевтическая композиция» относится в контексте настоящего изобретения к соединению или композиции, способной вызывать желаемый терапевтический эффект при правильном введении субъекту.

Термин «фармацевтически» или «фармацевтически приемлемый» относится в контексте настоящего изобретения к молекулярным соединениям и композициям, которые не приводят к неблагоприятной, аллергической или другой нежелательной реакции при надлежащем введении млекопитающему, особенно человеку. Фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу или вспомогательному веществу любого типа состава.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего изобретения может также называться «фармацевтически приемлемый разбавитель» или «фармацевтически приемлемые носители» и может включать растворители, наполнители, стабилизаторы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые физиологически совместимы.

Термин «терапевтическое средство» относится в контексте настоящего изобретения к средству, которое оказывает терапевтический эффект.

Далее различные аспекты настоящего изобретения определены более подробно. Каждый определенный таким образом аспект может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явно не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или выгодный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или выгодные.

Как указано выше, положения CDR и FR в VH и VL могут определяться с помощью любой из определенных выше аннотаций, таких как Chothia, Кабат, AbM или Contact.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения относится к антигенсвязывающему полипептиду, содержащему переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где CDR и FR указаны согласно Chothia,

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:62,

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63,

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR) 1-4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54,

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55,

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LFR) 1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, и/или по

меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 63, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 90 согласно нумерации Chothia в HFR3 содержит замену на остаток тирозин (Y),

и где антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3.

Согласно другим конкретным вариантам осуществления этого аспекта антигенсвязывающий полипептид содержит положительно заряженные аминокислоты:

(i) в одном или нескольких из следующих положений тяжелой цепи: 30, 31, 53 и 54, и/или

(ii) в одном или нескольких из следующих положений легкой цепи: 31 и 56,

и где положения указаны согласно нумерации Chothia.

Согласно другим конкретным вариантам осуществления этого аспекта антигенсвязывающий полипептид содержит

(a) положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи:

(i) в положении 30 представляет собой R, K или H,

(ii) в положении 31 представляет собой R, K или H,

(iii) в положении 53 представляет собой R, K или H, и/или

(iv) в положении 54 представляет собой R или K, и/или

(b) положительно заряженная аминокислота в легкой цепи

(i) в положении 31 представляет собой R или K, и/или

(ii) в положении 56 представляет собой R или K, где положения указаны согласно нумерации Chothia.

Альтернативно, первый аспект также может быть определен на основе аннотации Кабата следующим образом:

Антигенсвязывающий полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52,

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой A или N,

X₂ представляет собой E или Q, и/или

X₃ представляет собой Q или K

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR) 1-4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54,

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55,

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LFR) 1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) положение 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату содержит замену на остаток тирозин (Y),

и где антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3.

В частности, при объяснении следующих вариантов осуществления настоящего изобретения положения аминокислот в вариабельной области легкой цепи и вариабельной

области тяжелой цепи указаны в соответствии с нумерацией по Кабату, если не указано иное.

В контексте настоящего изобретения наблюдали, что мутация в положении 90 в HFR3 на Y приводит к увеличению связывания антигенсвязывающего полипептида с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$ и/или увеличению термостабильности (например, T_m °C или дельта T_m °C) по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим ни одной из указанных замен в (i)-(iv), и что эти положительные эффекты будут более выраженными, если сочетать их с одной, двумя или всеми заменами, указанными в (i)-(iii) выше. Повышенное связывание описывается как снижение EC50 связывания, что в настоящем документе упоминается, например, «x-кратное» снижение. Альтернативно, увеличение связывания также описано в настоящем документе как «% увеличения AUC связывания». Различия в T_m описываются как «дельта T_m °C», как определено в настоящем документе выше.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида положение 90 в HFR3 содержит замену на Y, и дополнительно по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида согласно первому аспекту настоящего изобретения положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту. Согласно одному варианту осуществления положение 90 в HFR3 содержит замену на Y.

Согласно одному варианту осуществления, положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и положение 90 в HFR3 содержит замену на Y.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида, положение 90 в HFR3 содержит замену на Y, положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и дополнительно по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не

является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида, положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и дополнительно по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1 согласно SEQ ID NO: 54, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или LCDR2 согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида, положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и дополнительно по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида, положение 90 в HFR3 содержит замену на Y, и дополнительно по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида, положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, положение 90 в HFR3 содержит замену на Y, и дополнительно по меньшей мере одна

аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида (iv) положение 90 в HFR3 содержит замену на Y, и (i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и (ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида (iv) положение 90 в HFR3 содержит замену на Y, и (iii) положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и (i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и (ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления, по меньшей мере одна аминокислота антигенсвязывающего полипептида заменена на положительно заряженную аминокислоту

в положениях HCDR1, и/или HCDR2, и/или LCDR1, и/или LCDR2, как определено выше и ниже, и не более четырех положений в CDR заменены положительно заряженными аминокислотами, предпочтительно не более трех положений в CDR заменены положительно заряженными аминокислотами.

Согласно одному варианту осуществления, по меньшей мере одна аминокислота антигенсвязывающего полипептида, которая заменена в HCDR1, и/или HCDR2, и/или LCDR1, и/или LCDR2, положительно заряженной аминокислотой, составляет не более 2, не более 3, не более 4 аминокислот. Согласно другим вариантам осуществления предпочтительно если положительно заряженная аминокислота присутствует в определенном положении в HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, HCDR2 согласно SEQ ID NO: 53, LCDR1 согласно SEQ ID NO: 54, LCDR2 согласно SEQ ID NO: 55, HCDR3 согласно SEQ ID NO: 56 или LCDR3 согласно SEQ ID NO: 57, причем указанная аминокислота не заменена другой положительно заряженной аминокислотой в контексте настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 52, содержащей аминокислотную последовательность SYVMH, S заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 52, содержащей аминокислотные последовательности SYVMH, Y заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 52, содержащей аминокислотные последовательности SYVMH, V заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 52, содержащей аминокислотные последовательности SYVMH, M заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения, антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR2 согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой Q, что означает, что N-концевой Y заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой Q, что означает, что F заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой Q, что означает, что G заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR2 согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что N-концевой Y заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что второй Y от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что третий Y от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что все три Y заменены на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что I заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что N-концевой N заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃

представляет собой К, что означает, что второй N от N-конца заменена на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что оба N заменены на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что P заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что V заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что T заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что F заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что G заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR2 согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой Q, что означает, что N-концевой Y заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой Q, что означает, что второй Y от N-конца заменена на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G,

YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой Q, что означает, что G заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления первого аспекта настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR2 согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что N-концевой Y заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что второй Y от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что третий Y от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что все три Y заменены на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что I заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что N-концевой N заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что второй N от N-конца заменена на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой Q, и X₃ представляет собой K, что означает, что оба N заменены на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления

представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что I заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что N-концевой N заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что второй N от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что оба N заменены на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что P заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что V заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что T заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой Q, что означает, что F заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления HCDR2 содержит SEQ ID NO: 53, содержащую аминокислотную последовательность YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G, где X₁ представляет собой N, X₂ представляет собой E, и X₃ представляет собой K, что означает, что G заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и HCDR2, как представлено выше и далее, содержит каркасные области

тяжелой цепи (HFR) 1-4, где положение 30 в HFR содержит замену на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и HCDR2, как представлено выше и далее, содержит HCDR3 и HFR1-4.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и HCDR2, как представлено выше и далее, содержит HCDR3 и HFR1-4, где предпочтительно положение 90 содержит замену на Y.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и HCDR2, как представлено выше и далее, содержит HCDR3 и HFR1-4, где положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1 согласно SEQ ID NO: 52, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и HCDR2, как представлено выше и далее, содержит HCDR3 и HFR1-4, где положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и положение 90 в HFR3 содержит замену на Y. Указанные последовательности HFR1-4 также могут содержать одну или несколько дополнительных модификаций, таких как замены, делеции или вставки, по сравнению с последовательностью FR, не содержащей ни одной из указанных модификаций. Однако предпочтительно последовательности FR1-4 не модифицировали в определенных положениях, например, в верньерной зоне, межцепочечном интерфейсе VH/VL или в положениях, определяющих канонический класс CDR. Предпочтительно HFR3 содержит остаток Y в положении 90. Ниже представлены дополнительные положения в FR, которые предпочтительно не следует модифицировать в контексте настоящего изобретения. Также предпочтительно определенные положения содержатся в FR и не содержатся в CDR, независимо от используемых аннотаций.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит переменную легкую цепь (VL), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54 (SATSSVSYMH), где по меньшей мере одна

аминокислота последовательности SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, N-концевой S заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, второй S от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, третий S от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, четвертый S от N-конца заменен на либо H, либо K, либо R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, все четыре S от N-конца заменены на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотные последовательности SATSSVSYMН, A заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотные последовательности SATSSVSYMН, T заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотные последовательности SATSSVSYMН, V может быть заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотные последовательности SATSSVSYMН, Y заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотные последовательности SATSSVSYMН, M заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит переменную легкую цепь (VL), содержащую определяющую комплементарность область легкой цепи 2 (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 (DTSKLAS), где по меньшей мере одна аминокислота последовательности SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотную последовательность DTSKLAS, T заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, S заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные

последовательности DTSKLAS, L заменен на либо H, либо K, либо R. Согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, A заменен на либо H, либо K, либо R.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54 (SATSSVSYMН), где по меньшей мере одна аминокислота последовательности SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 (DTSKLAS), где по меньшей мере одна аминокислота последовательности SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту.

В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, N-концевой S заменен на R, K или H, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L заменен на R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, второй S от N-конца заменен на R, K или H, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L заменен на R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, третий S от N-конца заменен на R, K или H, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L заменен на R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, четвертый S от N-конца заменен на R, K или H, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L заменен на R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, все четыре S заменены на R, K или H, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L заменен на R. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, N-концевой S заменен на K, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L может быть заменен на R, K или H. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, второй S от N-конца заменен на K, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKLAS, L может быть заменен на R, K или H. В частности, согласно

согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, третий S от N-конца заменен на К, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L может быть заменен на Н. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, четвертый S от N-конца заменен на К, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L может быть заменен на Н. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, все четыре S заменены на К, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L может быть заменен на Н.

В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, N-концевой S заменен на Н, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L заменен на Н. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, второй S от N-конца заменен на Н, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L заменен на Н. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, третий S от N-конца заменен на Н, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L заменен на Н. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, четвертый S от N-конца заменен на Н, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L заменен на Н. В частности, согласно одному варианту осуществления в случае SEQ ID NO: 54, содержащей аминокислотную последовательность SATSSVSYMН, все четыре S заменены на Н, и в случае SEQ ID NO: 55, содержащей аминокислотные последовательности DTSKЛAS, L заменен на Н.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54 (SATSSVSYMН), где по меньшей мере одна аминокислота последовательности SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или содержит LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 (DTSKЛAS), где по меньшей мере одна аминокислота последовательности SEQ ID NO: 55, которая не является положительно

заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, как указано выше, и дополнительно содержит в положении 30 в HFR1 положительно заряженную аминокислоту. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит HFR3. Особенно предпочтительно HFR3 содержит в положении 90 Y.

Согласно другому варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит VH и VL, содержащие HCDR1, и/или HCDR2, как определено выше, и/или LCDR2, как определено выше, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту, и где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, которая не является положительно заряженной, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена/заменены на положительно заряженную аминокислоту. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит HFR3. Особенно предпочтительно HFR3 содержит в положении 90 Y. Также предпочтительно антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит HFR1, где положение 30 в HFR1 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1 согласно SEQ ID NO: 54, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR2, как представлено выше и далее, содержит CDR 3 легкой цепи (LCDR3) и каркасные области легкой цепи (LFR) 1-4. Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1 согласно SEQ ID NO: 54, где по меньшей мере одна аминокислота, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR2, как представлено выше и далее, содержит CDR 3 тяжелой цепи (LCDR3) и каркасные области тяжелой цепи (LFR) 1-4. Указанные последовательности LFR1-4 также могут содержать одну или несколько дополнительных модификаций, таких как дополнительные замены, делеции или вставки, по сравнению с последовательностью FR, не содержащей ни одной из указанных модификаций. Однако согласно некоторым вариантам осуществления, в случае указанных дополнительных модификаций, модифицированные последовательности FR по-

прежнему содержат замены согласно настоящему изобретению, например, тирозин в положении 90 в FR3 в VH и/или положительно заряженную аминокислоту в положении 30 в VH. Кроме того, предпочтительно последовательности FR1-4 не модифицированы в определенных положениях, например, в верньерной зоне, межцепочечном интерфейсе VH/VL или в положениях, определяющих канонический класс CDR. Ниже представлены дополнительные положения в FR, которые предпочтительно не следует изменять в контексте настоящего изобретения. Также предпочтительно определенные положения содержатся в FR и не содержатся в CDR, независимо от используемых аннотаций.

Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, предпочтительно комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$ присутствует на Т-клетках, более предпочтительно на Т-лимфоцитах. Антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с Т-клеткой, экспрессирующей комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий полипептид связывается с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, содержащее аминокислотную последовательность VH согласно SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность VL согласно SEQ ID NO: 2. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий полипептид конкурирует с эталонным антителом за связывание с Т-клеткой, экспрессирующей комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, с антителом, содержащим VH согласно SEQ ID NO: 1 и VL согласно SEQ ID NO: 2. Согласно предпочтительному варианту осуществления эталонное антитело содержит константный домен, предпочтительно константный домен человеческого IgG1, и область легкой каппа-цепи человека. Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий полипептид конкурирует с эталонным антителом за связывание с Т-клеткой, экспрессирующей комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, с антителом, содержащим аминокислотную последовательность тяжелой цепи (HC) согласно SEQ ID NO: 60 и аминокислотную последовательность легкой цепи (LC) согласно SEQ ID NO: 6. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид конкурирует с эталонным антителом за связывание с клеткой, экспрессирующей комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, с антителом, содержащим аминокислотную последовательность тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 60 и аминокислотную последовательность легкой цепи согласно SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту осуществления согласно первому аспекту настоящего изобретения положительно заряженная аминокислота (аминокислоты), содержащаяся в HCDR и/или LCDR антигенсвязывающего полипептида, находится в положении (положениях) 31, 53 и/или 54 тяжелой цепи и/или в положении (положениях) 31 и/или 56 легкой цепи.

может дополнительно содержать Y в положении 90 в HFR3 в VH и/или положительно заряженную аминокислоту в положении 30 в VH.

Согласно одному варианту осуществления положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 30 представляет собой R, K или H. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 30 представляет собой R или K. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 30 представляет собой R. Согласно одному варианту осуществления положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 30 в HFR1 представляет собой R или K и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y.

Согласно одному варианту осуществления согласно первому аспекту настоящего изобретения положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R, K или H. Более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R или K. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R или K и в положении 90 представляет собой Y, или положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y.

Согласно одному варианту осуществления положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R, K или H. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой K, R или H и в положении 90 представляет собой Y в тяжелой цепи. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R или K. Более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R. Особенно предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y. Кроме того, предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего

полипептида в положении 53 представляет собой R или K, и серин присутствует в положении 30 тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида. Особенно предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R, и серин присутствует в положении 30 тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида.

Согласно одному варианту осуществления положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 54 представляет собой R или K. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 54 представляет собой K. Особенно предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 54 представляет собой K и в положении 90 представляет собой Y, или положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 54 представляет собой R и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y.

Согласно одному варианту осуществления положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R или K. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R. Особенно предпочтительно положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой R и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y, или положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 31 представляет собой K и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y.

Согласно одному варианту осуществления положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 56 представляет собой R или K. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 56 представляет собой R. Особенно предпочтительно положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 56 представляет собой R и в положении 90 представляет собой Y, или положительно заряженная аминокислота в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 56 представляет собой K и в положении 90 в HFR3 представляет собой Y.

В тяжелой цепи предпочтительны следующие комбинации положительно заряженных аминокислот: R31 и R53, R31 и K53, R31 и H53, R31 и R54, R31 и K54, K31 и R53, K31 и K53, K31 и H53, K31 и R54, K31 и K54, H31 и R53, H31 и K51, H31 и H51, H31

и R54, H31 и K54, R31, R53 и R54, R31, R53 и K54, R31, K53 и R54, R31, K53 и K54, R31, H53 и R54, R31, H53 и K54, K31, R53 и R54, K31, R53 и K54, K31, K53 и R54, K31, K53 и K54, K31, H53 и R54, K31, H53 и K54, H31, R53 и R54, H31, R53 и K54, H31, K53 и R54, H31, K53 и K54, H31, H53 и R54, H31, H53 и K54, R53 и R54, R53 и K54, K53 и R54, K53 и K54, H53 и R54, и H53 и K54. Антигенсвязывающий полипептид любого из этих вариантов осуществления может дополнительно содержать Y в положении 90 в FR3 в VH, и/или положительно заряженную аминокислоту в положении 30 в VH. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R, и антигенсвязывающий полипептид содержит Y в положении 90 в FR3 в VH.

В легкой цепи предпочтительны следующие комбинации положительно заряженных аминокислот: R31 и R56, R31 и K56, K31 и R56, и K31 и K56.

Следующие комбинации положительно заряженных аминокислот особенно предпочтительны в легкой цепи вместе с заменой в положении 90 в HFR3:

R31 и R56, и положение 90 представляет собой Y,

R31 и K56, и положение 90 представляет собой Y,

K31 и R56, и положение 90 представляет собой Y,

K31 и K56, и положение 90 представляет собой Y.

Особенно предпочтительными являются следующие комбинации положительно заряженных аминокислот в тяжелой цепи и в легкой цепи: тяжелая цепь 31R и легкая цепь 56R, тяжелая цепь 54K и легкая цепь 56R, тяжелая цепь 54K и легкая цепь 31R, тяжелая цепь 53R и легкая цепь 56R, тяжелая цепь 53R и легкая цепь 31R и 56R, и тяжелая цепь 31R, легкая цепь 31R и легкая цепь 56R.

Следующие комбинации положительно заряженных аминокислот в тяжелой цепи и в легкой цепи являются особенно предпочтительными, с заменой или без замены в положении 90 тяжелой цепи: тяжелая цепь 31R и легкая цепь 56R, а положение 90 тяжелой цепи содержит Y, тяжелая цепь 54K и легкая цепь 56R и положение тяжелой цепи 90Y, тяжелая цепь 54K и легкая цепь 31R и 56R и положение тяжелой цепи 90Y, тяжелая цепь 53R и легкая цепь 56R, тяжелая цепь 53R и легкая 56R и положение тяжелой цепи 90Y.

В контексте настоящего изобретения было обнаружено, что замены на положительно заряженные аминокислоты в антигенсвязывающем полипептиде (например, в соответствующих положениях в HCDR1, и/или HCDR2, и/или LCDR1, и/или LCDR2, и/или в положениях 30 HFR1, как определенные выше) обеспечивают повышенное

связывание с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$. Таким образом, обеспечивается снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим ни одной из замен согласно настоящему изобретению. Снижение связывания EC50 описывается как «х-кратное» уменьшение связывания EC50 или «% увеличение AUC связывания».

В контексте настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом Т-клеточного рецептора α/β (TCR)/CD3, и имеет повышенное связывание по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, причем антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере двукратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HFR3, содержащую остаток Y в положении 90 и показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит HFR3, содержащую Y в положении 90, и где антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит HFR3, содержащую Y в положении 90, и где антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна

аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит HFR3, содержащий Y в положении 90, и где антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит положительно заряженную аминокислоту в тяжелой цепи в положении 30 и показывает 2-кратное снижение EC50, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в положении 30 в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида представляет собой R, K или H, и антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, предпочтительно родительским антителом. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в положении 30 в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида представляет собой R или K, и антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительно содержит одну из следующих мутаций в тяжелой цепи: в положении 30R в положении 30K в положении 31R в положении 31K в положении 53R, в положении 54R, в положении 54K и показывают по меньшей мере 2-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительно содержит одну из следующих мутаций в тяжелой цепи: в положении 31R, в положении 31K, в положении 53R, в положении 54K, и показывают по меньшей мере 4-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительно содержит одну из следующих мутаций в тяжелой цепи: в положении 31R, в положении 53R, в положении 54K, и показывают по меньшей мере 5-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат одну мутацию в тяжелой цепи в положении 54K и показывают по меньшей мере 8-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R или 56K и показывают по меньшей мере 4-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и показывают по меньшей мере 8-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y и показывают по меньшей мере 3-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных аминокислотных комбинаций в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и показывают по меньшей мере 4-кратное

снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных аминокислотных комбинаций в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и показывают по меньшей мере 5-кратное снижение EC50 связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных аминокислотных комбинаций в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и показывают по меньшей мере 7-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 31R и в положении 90Y, и показывают по меньшей мере 8-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, предпочтительно родительским антителом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и дополнительно содержит мутацию в положении 90Y и показывают по меньшей мере 13-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R и показывают по меньшей мере 15-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R и показывают по меньшей мере 20-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Даже более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие

предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R и показывают по меньшей мере 30-кратное снижение EC50 связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Авторы настоящего изобретения неожиданно продемонстрировали в прилагаемых примерах, что AUC связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению увеличивается по сравнению с AUC связывания родительского антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно с AUC связывания родительского антитела, которая описывается в % увеличения связывания AUC. Таким образом, антигенсвязывающие полипептиды, предложенные в настоящем документе, имеют повышенную AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид, имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания, имеет по меньшей мере приблизительно 15% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 50% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 140% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 250% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 400% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 500% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 600% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 700% увеличение AUC связывания или по меньшей мере приблизительно 800% увеличение AUC связывания.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания, т.е. повышенное связывание с клеткой, экспрессирующей комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей

аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 15% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит в положении 90 в HFR3 Y и имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит в положении 90 в HFR3 Y, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно

заряженную аминокислоту и содержит в положении 90 в HFR3 Y, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит положение 90 в HFR3 Y, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере

приблизительно 10% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительно содержат одну из следующих замен в тяжелой цепи: в положении 30R, в положении 30K, в положении 31R в положении 31K, в положении 53R, в положении 54R, в положении 54K и имеют по меньшей мере приблизительно 15% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительно содержит одну из следующих мутаций в тяжелой цепи: в положении 30R, в положении 30K, в положении 31R в положении 31K, в положении 53R, в положении 54K и имеют по меньшей мере приблизительно 50% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит положительно заряженную аминокислоту в тяжелой цепи в положении 30 в HFR1 и показывает по меньшей мере 80% увеличение AUC. Предпочтительно положительно заряженная аминокислота в положении 30 в HFR1 антигенсвязывающего полипептида представляет собой R, K или H, и антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 80% увеличение AUC по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Даже более предпочтительно положительно заряженная аминокислота в положении 30 в HFR1 антигенсвязывающего полипептида представляет собой R или K, и антигенсвязывающий полипептид показывает по меньшей мере 80% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения предпочтительно содержат одну из следующих мутаций в тяжелой цепи: в положении 30R, в положении 30K, в положении 31R в положении 31K, в положении 53R, в положении 54K, и имеют по меньшей мере 100% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Особенно предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды имеет замену в тяжелой цепи в положении 31R и имеет приблизительно 140% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R, и имеют по меньшей

мере приблизительно 15% увеличение AUC связывания или более, по меньшей мере приблизительно 20% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 50% увеличение, по меньшей мере приблизительно 100%, или по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R, и имеет по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y и имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных аминокислотных комбинаций в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных аминокислотных комбинаций в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и имеют по меньшей мере приблизительно 250% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат аминокислотную комбинацию в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y, и имеет по меньшей мере приблизительно 300% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и дополнительно содержит мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y и имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания, по меньшей мере приблизительно 50% увеличение AUC связывания, приблизительно 100% увеличение AUC связывания, или приблизительно 200% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

легкой цепи в положении 56R имеет по меньшей мере приблизительно 500% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Авторы настоящего изобретения неожиданно продемонстрировали в прилагаемых примерах, что T_m антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению увеличена по сравнению с T_m родительского антигенсвязывающего полипептида, что описано в виде дельта T_m в °C или в абсолютных температурных значениях в °C. Таким образом, антигенсвязывающие полипептиды, представленные в настоящем документе, имеют увеличенную T_m по сравнению с исходным антигенсвязывающим полипептидом. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид имеет дельта T_m по меньшей мере 1°C, дельта T_m по меньшей мере 2°C, дельта T_m по меньшей мере 3°C, дельта T_m по меньшей мере 3,5°C или дельта T_m по меньшей мере 4°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Антигенсвязывающий полипептид, предложенный в настоящем документе, имеет повышенную T_m по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, предпочтительно по сравнению с родительским антителом, и имеет T_m по меньшей мере 72,5°C, имеет T_m по меньшей мере 72,8°C, имеет T_m по меньшей мере 73,8°C, имеет T_m по меньшей мере 74,8°C или имеет T_m по меньшей мере 75,3°C. Более предпочтительно антигенсвязывающий полипептид имеет T_m по меньшей мере 73,0°C, еще более предпочтительно по меньшей мере 73,5°C, имеет T_m по меньшей мере 74°C, имеет T_m по меньшей мере 75°C или имеет T_m по меньшей мере 76°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению имеет дельта T_m по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, таким как родительский антигенсвязывающий полипептид, содержащий аминокислотные последовательности VH и VL, как описано в настоящем документе в контексте родительского антитела ВМА031. (B36).

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению имеет дельта T_m по меньшей мере 1°C по сравнению с антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению, или T_m по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота

последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или имеет Tm по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, или имеет Tm по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HFR3, содержащую остаток Y в положении 90 и имеет дельта Tm по меньшей мере 2°C, предпочтительно по меньшей мере 2,5°C, более предпочтительно по меньшей мере 3°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит HFR3, содержащую Y в положении 90, и где антигенсвязывающий полипептид имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или имеет Tm по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно

SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту и содержит HFR3, содержащий Y в положении 90, и где антигенсвязывающий полипептид имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или имеет Tm по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или имеет Tm по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит HFR3, содержащий Y в положении 90, и где антигенсвязывающий полипептид имеет дельта Tm

по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом или имеет T_m по меньшей мере 72,8°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y и имеют дельта T_m по меньшей мере 1,0°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют дельта T_m по меньшей мере 1,0°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют дельта T_m по меньшей мере 2,0°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Даже более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют дельта T_m по меньшей мере 3,0°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, и в положении 53R и в положении 90Y, и имеют дельта T_m по меньшей мере 3,5°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y, и имеют дельта T_m по меньшей мере 4,0°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и дополнительно содержит мутацию в положении 90Y и имеют дельта T_m по меньшей мере 3,0°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R и имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R и имеют дельта Tm по меньшей мере 3,5°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y и имеют Tm по меньшей мере 73,0°C, имеют Tm по меньшей мере 74°C, имеют Tm по меньшей мере 75°C или имеют Tm по меньшей мере 76°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют Tm по меньшей мере 73,46°C. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют Tm по меньшей мере 74,46°C. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют Tm по меньшей мере 75,46°C.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающие полипептиды содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют Tm по меньшей мере 75,5°C. Даже более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат

одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y и имеют T_m по меньшей мере 75,9°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, и в положении 53R и в положении 90Y, и имеют T_m по меньшей мере 76,0°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y, и имеют T_m по меньшей мере 76,5°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и дополнительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y и имеют T_m по меньшей мере 72,0°C, T_m по меньшей мере 73,0°C, T_m по меньшей мере 74,0°C, T_m по меньшей мере 75,0°C, или T_m по меньшей мере 76,0°C. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид имеет T_m по меньшей мере 75,0°C. Даже более предпочтительно антигенсвязывающий полипептид имеет T_m по меньшей мере 75,5°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в положении 31R, в положении 90Y и в положении 56R, в положении 53R, в положении 90Y и в положении 56R, и в положении 54K и в положении 90Y и в положении 56R и имеют T_m по меньшей мере 74,0°C. Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в положении 31R, в положении 90Y и в положении 56R, в положении 53R, в положении 90Y и в положении 56R, и в положении 54K и в положении 90Y и в положении 56R и имеют T_m по меньшей мере 75,0°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R и имеют T_m по меньшей мере 76,0°C.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению имеет 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта

T_m по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта T_m по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта T_m по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта T_m по меньшей мере 1°C, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит в положении 90 в HFR3 Y и имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота

последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит в положении 90 в HFR3 Y, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 62, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту и содержит в положении 90 в HFR3 Y, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающего полипептида содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, где по меньшей мере одна аминокислота в HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, где по меньшей мере одна аминокислота в LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и содержит положение 90 в HFR3 Y, и где антигенсвязывающий полипептид имеет по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеет дельта Tm по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 90Y, имеют по меньшей мере приблизительно 10% увеличение AUC связывания и имеют дельта Tm по меньшей мере 1°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных аминокислотных комбинаций в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 1,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и в положении 54R и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и в положении 54K и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 240% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y, имеет дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеет по меньшей мере приблизительно 300% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, и в положении 53R и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,5°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат одну из следующих предпочтительных комбинаций аминокислот в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, и в положении 53R и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,5°C и имеют по меньшей мере приблизительно 250% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 4,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в тяжелой цепи в положении 53R и в положении 90Y, имеют дельта Tm по меньшей мере 4,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 250% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и дополнительно

содержит мутацию в положении 90Y и имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C, и имеют по меньшей мере приблизительно 150% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды предпочтительно содержат мутацию в легкой цепи в положении 56R и дополнительно содержат мутацию в положении 90Y и имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C, и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в легкой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в тяжелой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 300% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 400% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в

положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 500% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 600% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 700% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K и в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 2,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 800% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в положении в тяжелой цепи 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 300% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 400% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 500% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 600% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 700% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, имеют дельта Tm по меньшей мере 3,0°C и имеют по меньшей мере приблизительно 800% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Неожиданно было показано, что определенные замены в положениях, которые не несут положительно заряженные аминокислоты, на положительно заряженные аминокислоты, обеспечивают улучшенное связывание (например, AUC связывания (фиг. 5, верхняя панель)). Неожиданно было обнаружено, что положение 90Y приводит к значительному увеличению Tm (фиг. 5, нижняя панель). Аминокислоту Y в положении 90 можно рассматривать как строительный блок для улучшения Tm, поскольку замена Y в положении 90 приводит к увеличению Tm для всех протестированных молекул (см. Фиг. 5, нижняя панель). Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что молекулы, несущие Y в положении 90, вместе с заменой одного или нескольких положений положительно заряженными аминокислотами приводят – помимо увеличения Tm – к значительному увеличению/улучшению связывания (например, AUC связывания), т.е. эти замены приводят к синергетическим эффектам.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, положение 54R и в положении 90 Y, и в положении 54K и в положении 90Y, и предпочтительно указанные антигенсвязывающие полипептиды имеют дельта Tm по меньшей мере 3°C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и предпочтительно указанные антигенсвязывающие полипептиды имеют дельта Tm по меньшей мере 3°C и имеют по меньшей мере приблизительно 270% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Даже более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи: в положении 54K и в положении 90Y, и указанные антигенсвязывающие полипептиды имеют дельта Tm по меньшей мере 3°C и

имеют по меньшей мере приблизительно 240% увеличение AUC связывания по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в положении 31R, в положении 90Y в VH и в положении 56R в VL, в положении 53R, в положении 90Y в VH и в положении 56R в VL, и в положении 54K, в положении 90Y в VH и в положении 56R в VL, и имеют дельта Tm по меньшей мере 2,50°C и имеют по меньшей мере приблизительно 245% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в положении 31R, в положении 90Y в VH и в положении 56R в VL, в положении 53R, в положении 90Y в VH и в положении 56R в VL, и имеют дельта Tm по меньшей мере 3,50°C и имеют по меньшей мере приблизительно 400% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Особенно предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в положении 53R, в положении 90Y в VH и в положении 56R в VL, и имеют дельта Tm по меньшей мере 3,50°C и имеют по меньшей мере приблизительно 800% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, положение 54R и в положении 90 Y, и в положении 54K и в положении 90Y и предпочтительно имеют Tm по меньшей мере 75 °C и имеют по меньшей мере приблизительно 200% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи: в положении 31R и в положении 90Y, в положении 53R и в положении 90Y, и предпочтительно имеют Tm по меньшей мере 76 °C и имеют по меньшей мере приблизительно 270% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Даже более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие аминокислотные комбинации в тяжелой цепи: в положении 54K и в положении 90Y и имеют Tm по меньшей мере 75 °C и имеют по меньшей мере приблизительно 240%

увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y в VH и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и в тяжелой цепи в положении 54K, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и имеют Tm по меньшей мере 75 °C и имеют по меньшей мере приблизительно 245% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Более предпочтительно антигенсвязывающие полипептиды содержат следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 31R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в легкой цепи в положении 56R, и имеют Tm по меньшей мере 76 °C и имеют по меньшей мере приблизительно 400% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом. Особенно предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит следующие предпочтительные аминокислотные комбинации в тяжелой цепи и в легкой цепи: в тяжелой цепи в положении 53R, в положении 90Y и в тяжелой цепи в положении 56R, и имеют Tm по меньшей мере 76°C и имеют по меньшей мере приблизительно 800% увеличение AUC связывания, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

Согласно одному варианту осуществления согласно первому аспекту настоящего изобретения, антигенсвязывающий полипептид представляет собой антитело или его фрагмент. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид представляет собой биспецифическое антитело или его фрагмент. Более предпочтительно, антигенсвязывающий полипептид представляет собой биспецифическое антитело, дополнительно содержащее TCR, или его фрагмент.

Согласно одному варианту осуществления согласно первому аспекту настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид содержит VH и VL, образующие первый сайт связывания, как описано ранее, и дополнительно содержит второй сайт связывания. Предпочтительно указанный второй сайт связывания специфически связывается с белком клеточной поверхности. Предпочтительные белки клеточной поверхности выбраны из группы, состоящей из гликопротеина, белков MHC класса I, белков MHC класса II, β -микроглобулина, иммуноглобулинов, таких как IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, TCR, молекул корцепторов, таких как CD4 или CD8. Согласно предпочтительному варианту

осуществления белок клеточной поверхности представляет собой поверхностный белок раковой клетки. Предпочтительно второй сайт связывания антигенсвязывающего полипептида специфически связывается с комплексом МНС-пептид. Более предпочтительно молекула МНС представляет собой молекулу МНС I в комплексе с пептидом, где предпочтительно молекула МНС I представляет собой молекулу человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) в комплексе с пептидом. Еще более предпочтительно второй сайт связывания антигенсвязывающего полипептида специфически связывается с пептидным комплексом HLA раковой клетки, где предпочтительно HLA представляет собой HLA-A*02.

Согласно одному варианту осуществления второй антигенсвязывающий сайт антигенсвязывающего полипептида согласно первому аспекту настоящего изобретения содержится или образован антителом, TCR, каркасным белком или миметиком антитела, таким как сконструированные белки с анкириновым повтором (DARPs), ноттины, антикалины, финомеры или аффитела. Предпочтительно второй антигенсвязывающий сайт содержится в TCR или его фрагменте.

Согласно одному варианту осуществления второй антигенсвязывающий сайт антигенсвязывающего полипептида содержит по меньшей мере вариабельную область α (V_α), и/или β (V_β) цепи TCR, или γ (V_γ), и/или δ (V_δ) цепи TCR или VL, и/или VH другого антитела. Предпочтительно второй сайт связывания антигенсвязывающего полипептида содержит по меньшей мере V_α , и/или V_β или V_γ , и/или V_δ последовательности TCR. V_α и V_β или V_γ и V_δ второго антигенсвязывающего сайта могут находиться на двух отдельных полипептидных цепях. V_α и V_β или V_γ и V_δ второго антигенсвязывающего сайта могут находиться на одной и той же полипептидной цепи. Предпочтительно V_α и V_β или V_γ и V_δ второго антигенсвязывающего сайта находятся на двух отдельных полипептидных цепях. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит константный домен.

В контексте настоящего изобретения V_α и V_β или (V_γ или V_δ) предпочтительно связываются с комплексом опухолеассоциированный антиген (ТАА) /МНС. V_α и V_β или V_γ или V_δ , которые могут содержаться в антигенсвязывающем полипептиде согласно настоящему изобретению, подробно описаны, например, в WO2018172533, WO2018033291, WO2017158103, WO2018104438, WO2018104478, WO2019002444, WO2017158116, патенте США № 10800845, патенте США № 10537624, патенте США № 10538573, патенте США № 10537624, патенте США № 10590194, патенте США № 10800832, и патенте США № 10527623, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления $V\alpha$ и $V\beta$ или $V\gamma$ и $V\delta$ содержат или состоят из аминокислотной последовательности, раскрытой в WO2018172533, WO2018033291, WO2017158103, WO2018104438, WO2018104478, WO2019002444, WO2017158116 патенте США № 10800845, патенте США № 10537624, патенте США № 10538573, патенте США № 10537624, патенте США № 10590194, патенте США № 10800832, и патенте США № 10527623, и $V\alpha$ и $V\beta$ или $V\gamma$ и $V\delta$, описанные в цитированном уровне техники, связываются с пептидом ТАА, это раскрыто в тех же патентных заявках, которые процитированы. Содержание каждого из указанных документов включено в настоящий документ посредством ссылок во всей своей полноте.

Согласно аспекту пептиды опухолеассоциированного антигена (ТАА), которые можно использовать в способах и вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включают, например, пептиды ТАА, описанные в публикации США № 20160187351, публикации США № 20170165335, публикации США № 20170035807, публикации США № 20160280759, публикации США № 20160287687, публикации США № 20160346371, публикации США № 20160368965, публикации США № 20170022251, публикации США № 20170002055, публикации США № 20170029486, публикации США № 20170037089, публикации США № 20170136108, публикации США № 20170101473, публикации США № 20170096461, публикации США № 20170165337, публикации США № 20170189505, публикации США № 20170173132, публикации США № 20170296640, публикации США № 20170253633, публикации США № 20170260249, публикации США № 20180051080, публикации США № 20180164315, публикации США № 20180291082, публикации США № 20180291083, публикации США № 20190255110, патенте США № 9,717,774, патенте США № 9,895,415, публикации США № 20190247433, публикации США № 20190292520, публикации США № 20200085930, патенте США № 10,336,809, патенте США № 10131703, патенте США № 10081664, патенте США № 10081664, патенте США № 10093715, 10583573, и US20200085930, содержание каждого из указанных документов включено в настоящий документ посредством ссылок во всей своей полноте.

В контексте настоящего изобретения VL и/или VH дополнительного антитела предпочтительно связываются с белком, присутствующим на поверхности опухоли.

Согласно одному варианту осуществления VH и VL антигенсвязывающего полипептида относятся к антителу. Согласно одному варианту осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит VH и VL на двух отдельных полипептидных цепях. Согласно одному варианту осуществления первый антигенсвязывающий сайт содержит VH и VL на одной и той же полипептидной цепи. Предпочтительно VH и VL, содержащиеся в первом антигенсвязывающем сайте, находятся на двух отдельных полипептидных цепях, за

NO: 53 и SEQ ID NO: 55 (HCDR2 и LCDR2). Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55 (HCDR2 и LCDR1 и LCDR2). Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 54. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 53 (LCDR1 и HCDR2). Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту антигенсвязывающего полипептида в SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55 (LCDR1 и LCDR2). Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 55 (LCDR2). Предпочтительно по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 55 (LCDR2), SEQ ID NO: 53 (HCDR2) или SEQ ID NO: 52 (HCDR1). Более предпочтительно по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 52 (HCDR1) и SEQ ID NO: 55 (LCDR2). Особенно предпочтительно по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, антигенсвязывающего полипептида присутствует в последовательности согласно SEQ ID NO: 53 (HCDR2) и SEQ ID NO: 55 (LCDR2).

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит серин (S) или аспарагин (N) в положении 30 в HFR1 антигенсвязывающего полипептида. Кроме того, предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R или K, и серин присутствует в положении 30 в HFR1 антигенсвязывающего полипептида. Также предпочтительно положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида в положении 53 представляет собой R, и серин присутствует в положении 30 в HFR1 антигенсвязывающего полипептида.

антигенсвязывающего полипептида заменен на N, V в положении 56 в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида заменен на I, E в положении 100a в тяжелой цепи антигенсвязывающего полипептида заменен на D, и S в положении 31 и 93 в легкой цепи антигенсвязывающего полипептида заменен на N.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит дополнительные модификации в тяжелой цепи CDR3 (HCDR3). Согласно одному варианту осуществления указанная модификация представляет собой замену на отрицательно заряженную аминокислоту, такую как E или D. Предпочтительно аминокислота в положении 100 в HCDR3 заменена. Особенно предпочтительно в положении 100a содержит замену на E или D. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит дополнительные модификации в легкой цепи CDR3 (LCDR3). Согласно одному варианту осуществления, указанная модификация представляет собой замену на полярную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из R, H, K, D, E, N, Q, S, T, Y. Предпочтительно аминокислота в положении 93 в LCDR3 заменена. Особенно предпочтительно в положении 93 находится N или S. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит дополнительные модификации в тяжелой цепи HCDR3 и в LCDR3. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит замену на отрицательно заряженную аминокислоту в HCDR3 и замену на полярную аминокислоту в LCDR3. Предпочтительно положение 100a в HCDR3 содержит замену на отрицательно заряженную аминокислоту, и положение 93 в LCDR3 содержит замену на полярную аминокислоту. Даже более предпочтительно положение 100a в HCDR3 содержит замену на E и положение 93 в LCDR3 и содержит замену на полярную аминокислоту S, положение 100a в HCDR3 содержит замену на E и положение 93 в LCDR3 и содержит замену на полярную аминокислоту N, положение 100a в HCDR3 содержит замену на D, и положение 93 в LCDR3 и содержит замену на полярную аминокислоту S, положение 100a в HCDR3 содержит замену на D, и положение 93 в LCDR3 содержит замену на полярную аминокислоту N.

Согласно одному варианту осуществления HCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность GSYDYX₁GFVY (SEQ ID NO: 56), где X₁ представляет собой D или E. Предпочтительно X₁ представляет собой E (GSYDYEGFVY SEQ ID NO: 64). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWSX₁X₂X₃LT (SEQ ID NO: 57), где X₁ представляет собой S или N, X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, D, H, S, Y, A и N, и X₃ представляет собой P или A. Предпочтительно LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWSSX₂X₃LT

антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSSPLT (SEQ ID NO: 85). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSYPLT (SEQ ID NO: 86). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSAPLT (SEQ ID NO: 87). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSNPLT (SEQ ID NO: 88).

Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWSNQALT (SEQ ID NO: 89). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSDALT (SEQ ID NO: 90). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSHALT (SEQ ID NO: 91). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSSALT (SEQ ID NO: 92). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSYALT (SEQ ID NO: 93). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSAALT (SEQ ID NO: 94). Согласно одному варианту осуществления LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWNSNALT (SEQ ID NO: 95). Предпочтительно LCDR3 антигенсвязывающего полипептида имеет последовательность QQWSX₁NPLT (SEQ ID NO: 96), где X₁ представляет собой S или N. Даже более предпочтительно X₁ представляет собой S.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит или состоит из HFR1, HFR2 и HFR3, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), SEQ ID NO: 97 (GL1_BM_VH28_HV), SEQ ID NO: 98 (GL1_BM_VH31_HV), SEQ ID NO: 99 (HEBE1_H10_HV), SEQ ID NO: 100 (HEBE1_H66_HV), и SEQ ID NO: 101 (HEBE1_H71_HV). Предпочтительно HFR1, HFR2 и HFR3 содержатся в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению, в котором заменено положение 30 в HFR1 и/или положение 90 в HFR3, эта замена сохраняется, хотя остальные аминокислоты каркасных областей содержат или состоят из HFR1, HFR2 и HFR2, как указано выше.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит или состоит из LFR1, LFR2 и LFR3, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL) или SEQ ID NO: 102 (GL1BMVK43_VL). Предпочтительно

LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4 содержатся в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL).

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит или состоит из HFR1, HFR2 и HFR3, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), SEQ ID NO: 97 (GL1_BM_VH28_HV), SEQ ID NO: 98 (GL1_BM_VH31_HV), SEQ ID NO: 99 (HEBE1_H10_HV), SEQ ID NO: 100 (HEBE1_H66_HV), и SEQ ID NO: 101 (HEBE1_H71_HV) и содержит или состоит из LFR1, LFR2 и LFR3, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL). Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит или состоит из HFR1, HFR2 и HFR3, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), SEQ ID NO: 97 (GL1_BM_VH28_HV), SEQ ID NO: 98 (GL1_BM_VH31_HV), SEQ ID NO: 99 (HEBE1_H10_HV), SEQ ID NO: 100 (HEBE1_H66_HV), и SEQ ID NO: 101 (HEBE1_H71_HV) и содержит или состоит из LFR1, LFR2 и LFR3, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 102 (GL1BMVK43_VL). Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит HFR1, HFR2 и HFR3, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH) и содержит или состоит из LFR1, LFR2 и LFR3, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению, в котором заменено положение 30 в HFR1 и/или положение 90, эта замена сохраняется, хотя остальные аминокислоты каркасных областей содержат или состоят из HFR1, HFR2 и HFR2, как изложенное выше.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит или состоит из HFR4, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), или LFR4, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL). Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит или состоит из HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH) и содержит или состоит из LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL). Согласно предпочтительным вариантам осуществления антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению, в котором заменено положение 30 в HFR1 и/или положение 90, эта замена сохраняется, хотя остальные аминокислоты каркасных областей содержат или состоят из HFR1, HFR2 и HFR2, как изложенное выше.

Согласно другим вариантам осуществления, которые более подробно описаны ниже, антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению содержат каркасные области тяжелой цепи (HFR) и/или каркасные области легкой цепи (LFR) или их функциональные варианты, как определено в настоящем документе выше. Как определено выше, антигенсвязывающий полипептид, содержащий последовательности HFR или LFR, имеющие определенную степень идентичности последовательностей, также может проявлять сходные или более высокие функциональные свойства, такие как повышенное или улучшенное EC50 связывания или Tm. В частности, антигенсвязывающий полипептид, содержащий функциональные варианты HFR или LFR, имеет улучшенное или повышенное EC50 связывания по меньшей мере в 2 раза и/или имеет улучшенную или увеличенную Tm на по меньшей мере 1°C или дельту Tm по меньшей мере 1°C, как определено в настоящем документе выше. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит HFR1, как представлено в SEQ ID NO 103, или человеческую последовательность HFR1, имеющую по меньшей мере приблизительно 60% идентичности последовательности с HFR1, как представлено в SEQ ID NO: 103, HFR2, как представлено в SEQ ID NO 104, или человеческую последовательность HFR2, имеющую по меньшей мере приблизительно 75% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 104, HFR3, как представлено в SEQ ID NO 105, или человеческую последовательность HFR3, имеющую по меньшей мере приблизительно 55% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 105, и последовательность HFR4, как представлено в SEQ ID NO: 106, или человеческую последовательность HFR4, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 106. В каждом из этих случаев предпочтительные аминокислотные замены в HFR, описанных выше, сохраняются, в частности, в положении 30 и/или 90. Например, HFR1 SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH) имеет идентичность последовательности 63,33% с HFR1 SEQ ID NO: 100 (HEBE1_H66_HV), или HFR2 SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH) имеет идентичность последовательности 78,6% с HFR2 SEQ ID NO: 99 (HEBE1_H10_HV). Таким образом, предполагается, что каркасные области, представленные в настоящем документе выше и ниже, содержатся в представленных в настоящем документе антигенсвязывающих полипептидах.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит HFR1, HFR2, HFR3, и HFR4 согласно SEQ ID NO: 103 - SEQ ID NO: 106 или человеческую последовательность HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, имеющую в каждом случае, по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 103 - SEQ

ID NO: 106, соответственно. Согласно вариантам осуществления, где антигенсвязывающий полипептид содержит 90Y в тяжелой цепи, представленная выше и ниже каркасная область антигенсвязывающего полипептида содержит HFR с определенной идентичностью последовательности и дополнительно содержит 90Y в тяжелой цепи.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит LFR1, как представлено в SEQ ID NO 107, или человеческую последовательность LFR1, имеющую по меньшей мере приблизительно 50% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 107, LFR2, как представлено в SEQ ID NO 108, или человеческую последовательность LFR2, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 108, последовательность LFR3, как представлено в SEQ ID NO: 109, или человеческую последовательность LFR3, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 109, и последовательность LFR4, как представлено в SEQ ID NO: 110, или человеческую последовательность LFR4, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 110. Согласно предпочтительному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит LFR1, LFR2, LFR 3, и LFR4 согласно SEQ ID NO: 107 - SEQ ID NO: 110, или человеческую последовательность LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, имеющую в каждом случае по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO:107 - SEQ ID NO: 110, соответственно.

Предпочтительно последовательности HFR1-4 и LFR1-4, имеющие по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90 или 95% идентичности с соответственно указанными аминокислотными последовательностями согласно SEQ ID NO: 103 - 110, не модифицированы в определенных положениях, например, положениях верньерной зоны, положениях, которые вносят вклад в межцепочечный интерфейс VH/VL, или положениях, определяющих канонический класс CDR. В вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий полипептид содержит Y90 в тяжелой цепи, антигенсвязывающий полипептид, содержащий представленные выше и ниже каркасные области, содержит 90Y в тяжелой цепи. В вариантах осуществления, в которых антигенсвязывающий полипептид содержит положительно заряженную аминокислоту в положении 30 тяжелой цепи, антигенсвязывающий полипептид, содержащий представленные выше и ниже каркасные области, содержит положительно заряженную аминокислоту в положении 30 тяжелой цепи. Во всех следующих вариантах осуществления сохраняются последовательности HCDR согласно (i) первого аспекта изобретения и последовательности LCDR согласно (ii).

Согласно конкретным аспектам положениями, которые не модифицированы в VL, являются положение 6, положение 23, положение 38, положение 44, положение 59, положение 61, положение 62, положение 64, положение 66, положение 82, положение 86, положение 87, положение 88, положение 98, положение 99 и/или положение 101.

Согласно конкретным аспектам положениями, которые не модифицированы в VH, являются положение 6, положение 14, положение 22, положение 36, положение 37, положение 39, положение 45, положение 46, положение 69, положение 71, положение 78, положение 86, положение 91, положение 92, положение 103, положение 104 и положение 106.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты 14P, 46E, 86D, 104G и 106G и содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv).

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, содержит аминокислоты 59P, 61R, 62F, 82D, 99G, и 101G и содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты 14P, 46E, 86D, 104G и 106G, и содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv), и домен VL согласно SEQ ID NO: 2 или имеющий по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты 59P, 61R, 62F, 82D, 8 99G и 101G и содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоту: 6Q и 36W, и содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv).

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты 6Q и 86Y, и антигенсвязывающий полипептид и содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоту 6Q и 36W, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv)., и домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты 6Q и 86Y, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 22C, 37V, 39Q, 45L, 69L, 71S, 78A, 91Y, 92C и 103W, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv).

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: C23, 38Q, 44P, 64G, 66G, 87Y, 88C и 98F, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 22C, 37V, 39Q, 45L, 69L, 71S, 78A, 91Y, 92C и 103W, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv), и домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 23C, 38Q, 44P, 64G, 66G, 87Y, 88C и 98F, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 6Q, 14P, 22C, 36W, 37V, 39Q, 45L, 46E, 69L, 71S, 78A, 86D, 91Y, 92C, 103W, 104G, и 106G, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv).

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 6Q, 23C, 38Q, 44P, 59P, 61R, 62F, 64G, 66G, 82D, 86Y, 88C, 98F, 99G, и 101G, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему

изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления, предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где домен VH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 6Q, 14P, 22C, 36W, 37V, 39Q, 45L, 46E, 69L, 71S, 78A, 86D, 91Y, 92C, 103W, 104G, и 106G, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности HCDR1, и/или HCDR2, как указано в (i) первого аспекта настоящего изобретения, и/или замены, как указано в (iii), и/или (iv), и домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и где домен VL, имеющий по меньшей мере 80% идентичности последовательности, содержит аминокислоты: 6Q, 23C, 38Q, 44P, 59P, 61R, 62F, 64G, 66G, 82D, 86Y, 88C, 98F, 99G и 101G, и антигенсвязывающий полипептид содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению, в частности LCDR1, и/или LCDR2, как указано в (ii) первого аспекта настоящего изобретения

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит VH, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 (VH H90Y), SEQ ID NO: 9 (VH_T30N_S31R), SEQ ID NO: 10 (VH_T30S_S31R_Y53R_E100aD), SEQ ID NO: 11 (VH S31R), SEQ ID NO: 12 (VH_T30S_Y53R), SEQ ID NO: 14 (VH N54K H90Y), SEQ ID NO: 15 (VH_T30N_S31N_Y53R), SEQ ID NO: 16 (VH_T30N_S31R_V56I), SEQ ID NO: 17 (VH_S31R_N54K_E100aD), SEQ ID NO: 19 (VH_T30R), SEQ ID NO: 20 (VH T30K), SEQ ID NO: 21 (VH S31K), SEQ ID NO: 22 (VH_Y53R), SEQ ID NO: 23 (VH_Y53K), SEQ ID NO: 24 (VH_N54R), SEQ ID NO: 25 (VH N54K), SEQ ID NO: 29 (VH_Y53H), SEQ ID NO: 30 (VH_S31H), SEQ ID NO: 31 (VH S31R H90Y), SEQ ID NO: 32 (VH Y53R H90Y), SEQ ID NO: 33 (VH N54R H90Y) и SEQ ID NO: 34 (VH_E61Q_H90Y), или ее вариант VH, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33, и 34, соответственно, где вариант VH сохраняет соответствующую замену (замены) согласно настоящему изобретению по сравнению с VH с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и предпочтительно содержит HCDR1 - 3 последовательностей согласно SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33 и 34, соответственно. В контексте настоящего изобретения «сохраняет

соответствующую замену (замены)» означает, что замены (замены) согласно настоящему изобретению, как представлено, сохраняются. Таким образом, согласно конкретным аспектам, антигенсвязывающий полипептид, который идентичен с приведенным % данной SEQ ID NO, сохраняет замену (замены) согласно настоящему изобретению, например, (i) в одном или нескольких из следующих положений тяжелой цепи: 30, 31, 53 и 54, и/или (ii) в одном или нескольких из следующих положений легкой цепи: 31 и 56, и/или в положении 90 тяжелой цепи. Согласно предпочтительным аспектам, антигенсвязывающий полипептид содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33 и 34. Согласно конкретным аспектам, антигенсвязывающий полипептид содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11 (VH S31R), или SEQ ID NO: 22 (VH_Y53R). Согласно другим предпочтительным аспектам, антигенсвязывающий полипептид может также представлять собой функциональный фрагмент представленных выше VH, причем функциональный фрагмент содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 (VL S31R S56R), SEQ ID NO: 13 (VL S31N S56R S93N), SEQ ID NO: 18 (VL S56R), SEQ ID NO: 26 (VL_S31R), SEQ ID NO: 27 (VL_S31K), и SEQ ID NO: 28 (VL_S56K), или ее вариант VL, содержащий аминокислотную последовательность, на меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 18, 26, 27, и 28, соответственно, где вариант VL сохраняет соответствующую замену (замены) согласно настоящему изобретению по сравнению с VL с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и предпочтительно содержит LCDR1 - 3 указанных последовательностей согласно SEQ ID NO: 8, 13, 18, 26, 27, и 28, соответственно. В контексте настоящего изобретения «сохраняет соответствующую замену (замены)» означает, что замены (замены) согласно настоящему изобретению, как представлено, сохраняются. Таким образом, согласно конкретным аспектам, антигенсвязывающий полипептид, который идентичен с приведенным % данной SEQ ID NO, сохраняет замену (замены) согласно настоящему изобретению, например, (i) в одном или нескольких из следующих положений тяжелой цепи: 30, 31, 53 и 54, и/или (ii) в одном или нескольких из следующих положений легкой цепи: 31 и 56, и/или в положении 90 тяжелой цепи. Согласно предпочтительным аспектам, антигенсвязывающий полипептид содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8,

13, 18, 26, 27 и 28. Согласно другим предпочтительным аспектам, антигенсвязывающий полипептид может также представлять собой функциональный фрагмент представленных выше VL, причем функциональный фрагмент содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению.

Ниже изложены конкретные комбинации предложенных в настоящем документе VH и VL. Понятно, что предоставленные выше VH и VL можно комбинировать соответственно.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит VH и VL, содержащие последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO 7 и SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 10 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 12 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 15 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 16 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 17 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 1 и SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 12 и SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 12 и SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 14 и SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 14 и SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 19 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 20 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 21 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 22 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 23 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 24 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 25 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 1 и SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 1 и SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 1 и SEQ ID NO 28, SEQ ID NO 29 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 30 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 7 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 31 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 31 и SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 32 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 33 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 32 и SEQ ID NO 18, SEQ ID NO 7 и SEQ ID NO 18.

Согласно другим предпочтительным аспектам, антигенсвязывающий полипептид может также представлять собой функциональный фрагмент (фрагменты) представленных выше VL и VH, где функциональный фрагмент (фрагменты) содержит замену (замены) согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит VH и VL согласно SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 22 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 14 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 31 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 32 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 18 (VH_Y53R_H90Y и VL_S56R), SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18 (VH_N54K_H90Y и VL_S56R) SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 18 (VH_S31R_H90Y и VL_S56R) или SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 2 (VH_H90Y и BMA031 (V36)_VL).

Более предпочтительно антигенсвязывающий полипептид содержит VH и VL согласно SEQ ID NO 11 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 22 и SEQ ID NO 2, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO 14 и SEQ ID NO 2 или SEQ ID NO 31 и SEQ ID NO 2.

Как описано выше и ниже, настоящее изобретение предпочтительно относится к антигенсвязывающему полипептиду, где VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 (VH Y53R H90Y) или ее вариант VH, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 32, где вариант VH сохраняет соответствующие замены (Y53 и H90Y или соответствующие аминокислотные замены) по сравнению с VH с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и где VL содержит VL антитела, связывающегося с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$ (как определено в настоящем документе), в частности, при этом VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Согласно дополнительным предпочтительным аспектам антигенсвязывающий полипептид может также представлять собой функциональные фрагменты определенных выше VH и VL, причем функциональные фрагменты содержат замену (замены) согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид включает дополнительные модификации, например, дополнительную замену (замены) аминокислоты (аминокислот) из той же категории аминокислот в CDR. Дальнейшие модификации могут состоять в замене полярной незаряженной аминокислоты другой полярной незаряженной аминокислотой, замене отрицательно заряженной аминокислоты другой отрицательно заряженной аминокислотой и/или замене гидрофобной аминокислоты другой гидрофобной аминокислотой. Дальнейшие модификации также могут представлять собой замену полярной незаряженной аминокислоты другой полярной незаряженной аминокислотой, замену отрицательно заряженной аминокислоты другой отрицательно заряженной аминокислотой и замену гидрофобной аминокислоты другой гидрофобной аминокислотой.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи, и положение 56 в легкой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, где предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на R, и положение 56 в легкой цепи содержит замену на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи согласно SEQ ID NO: 1, и положение 56 в легкой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, и положение 90 в тяжелой цепи представляет собой Y, предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на R, и положение 56 в легкой цепи содержит замену на R, и положение 90 в тяжелой цепи представляет собой Y.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и положение 90 в тяжелой цепи

Согласно одному варианту осуществления положения 31 и 53 в тяжелой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положения 31 и 53 в тяжелой цепи заменены на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 53 в тяжелой цепи и положения 31 и 56 в легкой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, где предпочтительно положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на R, положения 31 и 56 в легкой цепи заменены на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на K.

Согласно одному варианту осуществления положение 30 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 30 в тяжелой цепи содержит замену на K.

Согласно одному варианту осуществления положение 56 в легкой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 56 в легкой цепи содержит замену на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 56 в легкой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 56 в легкой цепи содержит замену на K.

Согласно одному варианту осуществления положение 54 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 54 в тяжелой цепи содержит замену на K.

Согласно одному варианту осуществления положение 54 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и положение 90 в тяжелой цепи содержит замену на гидрофобную аминокислоту, предпочтительно положение 54 в тяжелой цепи содержит замену на K, и положение 90 в тяжелой цепи содержит замену на Y.

Согласно одному варианту осуществления положения 31 и 54 в тяжелой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, где предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на R, и положение 54 в тяжелой цепи содержит замену на K.

Согласно одному варианту осуществления положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, где предпочтительно положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на R].

Согласно одному варианту осуществления положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и положение 90 представляет собой Y, где предпочтительно положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на R, и положение 90 представляет собой Y.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 в тяжелой цепи и положения 31 и 56 в легкой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, где предпочтительно положение 31 в тяжелой цепи содержит замену на R, и положения 31 и 56 в легкой цепи заменены на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, где предпочтительно положение 53 в тяжелой цепи содержит замену на R.

Согласно одному варианту осуществления положение 31 и 56 в легкой цепи содержат замену на положительно заряженную аминокислоту, и где положение 90 в тяжелой цепи содержит замену на гидрофобную аминокислоту, где предпочтительно положения 31 и 56 в легкой цепи заменены на R, и положение 90 в тяжелой цепи содержит замену на Y.

Согласно одному варианту осуществления VH и VL или V α и V β ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Предпочтительно VH и VL или V α и V β ковалентно связаны дисульфидной связью.

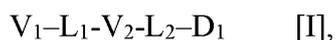
Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит один или несколько дополнительных антигенсвязывающих сайтов. Например, если антигенсвязывающий полипептид содержит первый и второй сайт связывания и дополнительно содержит дополнительный сайт связывания, антигенсвязывающий полипептид может быть триспецифичной молекулой или трехвалентным и т.д. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид может дополнительно содержать трансмембранную область. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид может дополнительно содержать трансмембранную область, необязательно включающую цитоплазматическую сигнальную область. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий

полипептид может дополнительно содержать диагностический агент. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид может дополнительно содержать терапевтический агент. Согласно варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению можно вводить одновременно, до или после различных лекарственных средств и методов лечения, широко используемых при лечении рака, таких как, например, химиотерапевтические средства, нехимиотерапевтические, противоопухолевые средства и/или облучение, предпочтительно химиотерапевтические средства. Согласно одному варианту осуществления такой терапевтический агент может представлять собой агент, ингибирующий рост, такой как цитотоксический агент или радиоактивный изотоп.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению можно использовать в биспецифическом формате, в частности, в биспецифических молекулах TCER®. Неожиданно было показано, что биспецифические молекулы, содержащие антигенсвязывающий полипептид, содержащий первый сайт связывания, как определено выше, который замещен по меньшей мере одной положительно заряженной аминокислотой в соответствующих положениях в HCDR1, и/или HCDR2, и/или LCDR1, и/или LCDR2, и дополнительно содержащие второй сайт связывания, который содержит, например, TCR или его фрагменты, демонстрируют улучшенные эффекторные функции в биспецифическом формате. Как показано в приведенных ниже примерах, такие биспецифические молекулы, содержащие первый и второй сайт связывания, как определено в настоящем документе выше, демонстрируют повышенную эффективность в отношении опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток (см. пример 3, описанный ниже). Таким образом, неожиданно было показано, что антигенсвязывающие полипептиды, описанные выше в соответствии согласно первому аспекту настоящего изобретения, также являются функциональными и демонстрируют улучшение в биспецифическом формате. Также неожиданно было показано, что антигенсвязывающие полипептиды согласно первому аспекту настоящего изобретения, как описано выше, проявляют повышенную эффективность в отношении опосредованного Т-клетками уничтожения опухолей пептид-HLA-положительных опухолевых клеток и, кроме того, почти не обладают цитотоксичностью в отношении пептид-HLA-отрицательных клеточных линий, обнаруживаются в биспецифическом каркасе TCER® по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, содержащим VH BMA031 (V36) в формате TCER®. Эффективность указанных биспецифических молекул TCER® оценивали путем измерения значений высвобождаемой LDH и EC50 (функциональная EC50, как определено в настоящем документе выше).

Например, функциональная EC50 антигенсвязывающего полипептида против клеток Hs695T и клеток U2OS снижена по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, содержащим VH и VL BMA031 (V36) в формате TCER®.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит первую и вторую полипептидные цепи, которые образуют первый и второй антигенсвязывающие сайты, где первая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:



где

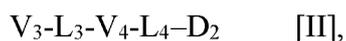
V_1 представляет собой первый переменный домен,

V_2 представляет собой второй переменный домен,

L_1 и L_2 представляют собой линкеры, L_2 присутствует или отсутствует,

D_1 представляет собой домен димеризации и присутствует или отсутствует,

и где вторая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:



где

V_3 представляет собой третий переменный домен,

V_4 представляет собой четвертый переменный домен,

L_3 и L_4 представляют собой линкеры, L_4 присутствует или отсутствует, и

D_2 представляет собой домен димеризации и присутствует или отсутствует,

где D_1 и D_2 специфически связываются друг с другом, и где

один из V_1 , V_2 , V_3 , V_4 представляет собой V_H , как определено в контексте настоящего изобретения,

один из V_1 , V_2 , V_3 , V_4 представляет собой V_L , как определено в контексте один из V_1 , V_2 , V_3 , V_4 представляет собой V_α или V_γ в TCR, и

один из V_1 , V_2 , V_3 , V_4 представляет собой V_β или V_δ указанного TCR.

Согласно одному варианту осуществления, V_H и V_L образуют первый сайт связывания, и V_α и V_β или V_γ и V_δ образуют второй сайт связывания.

Согласно одному варианту осуществления, V_1 или V_2 представляет собой V_L , как определено в контексте настоящего изобретения и V_3 или V_4 представляет собой V_H , как определено в контексте настоящего изобретения, и V_3 или V_4 представляет собой V_α или V_γ и V_1 или V_2 представляет собой V_β или V_δ последовательности TCR.

Согласно одному варианту осуществления V_1 или V_2 представляет собой V_H , как определено в контексте настоящего изобретения и V_3 или V_4 представляет собой V_L , как

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит $V_1 - V_4$ следующим образом: V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_L , и V_3 представляет собой V_α или V_γ , V_4 представляет собой V_β или V_δ .

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит $V_1 - V_4$ следующим образом: V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_α или V_γ , и V_4 представляет собой V_β или V_δ .

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит $V_1 - V_4$ следующим образом: V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_L , V_3 представляет собой V_β или V_δ , и V_4 представляет собой V_α или V_γ .

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит $V_1 - V_4$ следующим образом: V_1 представляет собой V_L , V_2 представляет собой V_H , V_3 представляет собой V_β или V_δ , и V_4 представляет собой V_α или V_γ .

Что касается формул I и II, предпочтительно, чтобы V_H и V_L располагались на разных полипептидных цепях, и V_α или V_γ и V_β или V_δ располагались на разных полипептидных цепях, и чтобы домены димеризации D1 и D2 представляли собой домены гетеродимеризации. Особенно предпочтительно в антигенсвязывающем полипептиде V_1 представляет собой V_H , V_2 представляет собой V_β , V_3 представляет собой V_α , and V_4 представляет собой V_L . Согласно одному варианту осуществления D1 и D2 антигенсвязывающего полипептида представляют собой домены Fc, предпочтительно пару доменов Fc, и предпочтительно являются разными и содержат мутацию, которая вызывает гетеродимеризацию, предпочтительно мутацию «выступ во впадину».

L_1, L_2, L_3, L_4 , если присутствуют, могут составлять 2-25, 2-20 или 3-18 аминокислот в длину. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер, такой как L_1, L_2, L_3, L_4 может представлять собой пептид длиной не более 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислот. Согласно другим вариантам осуществления линкер, такой как L_1, L_2, L_3, L_4 , может составлять 5-25, 5-15, 4-11, 10-20 или 20-30 аминокислот в длину.

Согласно одному варианту осуществления L_1 , и/или L_3 имеют длину 5-15 аминокислот, предпочтительно 5-10 аминокислот, более предпочтительно 8 аминокислот. Согласно предпочтительному варианту осуществления, L_2 и L_4 отсутствуют, и L_1 и L_3 присутствуют и имеют длину 5-10, предпочтительно 8 аминокислот. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, как описано в настоящем документе выше, может быть использован в любом формате, как определено в настоящем документе выше, например, в биспецифическом формате или формате COVD. Предпочтительно антигенсвязывающий полипептид представляет собой биспецифическую молекулу. Еще более предпочтительно

антигенсвязывающий полипептид представляет собой биспецифическую молекулу TCER®.

Согласно одному варианту осуществления V1, представляющий собой VH или VL, и V2, представляющий собой VH или VL, соответственно, образуют первый сайт связывания и содержат VH и VL, такие как содержащиеся в антигенсвязывающем полипептиде, как подробно определено выше, и имеющем по меньшей мере одну положительно заряженную аминокислоту в соответствующих положениях, как определено выше.

Согласно одному варианту осуществления биспецифические молекулы, описанные в настоящем документе, содержат формат TCER®, как описано в настоящем документе, и демонстрируют повышенную цитотоксичность, вычисленную как функциональная EC₅₀, как описано в настоящем документе выше, и предпочтительно имеют функциональную EC₅₀ менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ и в частности менее 500 пМ. Предпочтительно биспецифическая молекула представляет собой биспецифическую молекулу TCER®, как определено в настоящем документе выше и ниже, и имеет функциональную EC₅₀ менее 1000 пМ, менее 900 пМ, менее 800 пМ, менее 700 пМ, менее 600 пМ и в частности менее 500 пМ.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид относится к биспецифическому антигенсвязывающему полипептиду и содержит первую и вторую полипептидные цепи, которые образуют первый и второй антигенсвязывающие сайты, причем первая и вторая полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулы (I) и (II), как определено выше, и где первая полипептидная цепь содержит первый сайт связывания, который специфически связывается с комплексом TCR $\alpha/\beta/CD3$, и содержит первый вариабельный домен (V1) и второй вариабельный домен (V2), и где первый вариабельный домен представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи (VH), а второй вариабельный домен представляет собой вариабельный домен легкой цепи (VL), как определено в настоящем документе выше, и при этом вторая полипептидная цепь содержит второй сайт связывания антигена, который содержит третий вариабельный домен (V3) и четвертый вариабельный домен (V4), и при этом третий вариабельный домен содержит вариабельный альфа-домен (V α) и вариабельный бета-домен (V β).

Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит первую полипептидную цепь, содержащую VH и VL, образующие первый антигенсвязывающий сайт, и при этом VH и VL содержат HCDR и LCDR, содержащие по меньшей мере одну положительно заряженную аминокислоту, как

определено выше в контексте настоящего изобретения, и содержит $V\alpha$ и $V\beta$, образующие второй сайт связывания, и при этом $V\alpha$ и $V\beta$ содержат $V\alpha$ CDR1-3 и $V\beta$ CDR1-3 TCR. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит VH и VL, образующие первый сайт связывания антигена, в VH HFR1-4 и в VL LFR1-4, как определено в настоящем документе выше, а также в $V\alpha$ и $V\beta$, образующие второй сайт связывания FR1-4 $V\alpha$ и FR1-4 $V\beta$.

Согласно предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит первую полипептидную цепь, содержащую VH и VL, образующие первый сайт связывания антигена, и при этом VH и VL содержат HCDR и LCDR, содержащие по меньшей мере одну положительно заряженную аминокислоту, как определено выше, и тирозин в положении 90 в VH, и содержит $V\alpha$ и $V\beta$, образующие второй сайт связывания, и при этом $V\alpha$ и $V\beta$ содержат $V\alpha$ CDR1-3 и $V\beta$ CDR1-3 TCR. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит VH и VL, образующие первый сайт связывания антигена, в VH HFR1-4 и в VL LFR1-4, как определено в настоящем документе выше, а также в $V\alpha$ и $V\beta$, образующих второй сайт связывания FR1-4 $V\alpha$ и FR1-4 $V\beta$.

Согласно одному варианту осуществления, антигенсвязывающий полипептид содержит первую полипептидную цепь формулы [I], дополнительно содержит на своем С-конце линкер (L2) и домен димеризации (D1) или его часть и/или содержит вторую полипептидную цепь формулы [II], дополнительно содержит на С-конце линкер (L4) и домен димеризации (D2) или его часть, где D1 и D2 специфически связываются друг с другом. Домены димеризации определены в настоящем документе выше в разделе «определения». Предпочтительно линкеры L1 и L3 имеют длину 10-25 аминокислот или 5-10 аминокислот, более предпочтительно 8 аминокислот. Согласно одному варианту осуществления первая полипептидная цепь формулы [I] дополнительно содержит на своем С-конце линкер (L2) и домен Fc1 или его часть, и/или вторая полипептидная цепь формулы [II] дополнительно содержит на своем С-конце линкер (L4) и домен Fc2 или его часть. Домен Fc определен в настоящем документе выше в разделе «определения» и специфически связывается друг с другом. Fc1 и Fc2 различны и специфически связываются друг с другом, и их последовательности, например, указаны ниже.

Согласно одному варианту осуществления домен Fc представляет собой домен Fc человеческого IgG, предпочтительно полученный из человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно IgG1 или IgG2, более предпочтительно IgG1. В частности, когда биспецифический антигенсвязывающий полипептид содержит два домена Fc, т.е. в формате TCER®, описанном в настоящем документе выше (например, Fc1 и Fc2), два домена Fc

могут относиться к одному и тому же изотипу или подклассу изотипа иммуноглобулина или к разным изотипам или подклассам изотипа иммуноглобулина, предпочтительно к одному и тому же. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления Fc1 и Fc2 относятся к подклассу IgG1, или к подклассу IgG2, или к подклассу IgG3, или к подклассу IgG4, предпочтительно к подклассу IgG1, или к подклассу IgG2, более предпочтительно к подклассу IgG1.

Согласно некоторым вариантам осуществления домен Fc содержит или дополнительно содержит «RF мутацию» и/или «выступ во впадину», предпочтительно «выступ во впадину». Предпочтительно Fc1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 124 (впадина), а Fc2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 125 (выступ).

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит первую полипептидную цепь, содержащую формулу [I] V₁-L₁-V₂-L₂-D₁, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 39, и содержит вторую полипептидную цепь, содержащую формулу I [II] V₃-L₃-V₄-L₄-D₂, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 35. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит первую полипептидную цепь, содержащую формулу [I] V₁-L₁-V₂-L₂-D₁, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 39, и содержит вторую полипептидную цепь, содержащую формулу I [II] V₃-L₃-V₄-L₄-D₂, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 38.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид содержит первую полипептидную цепь, содержащую формулу [I] V₁-L₁-V₂-L₂-D₁, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 39, и содержит вторую полипептидную цепь, содержащую формулу I [II] V₃-L₃-V₄-L₄-D₂, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 36. Согласно этому варианту осуществления родительский антигенсвязывающий полипептид может содержать первую полипептидную цепь, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 39, и может содержать вторую полипептидную цепь, содержащую или состоящую из последовательности согласно SEQ ID NO: 37.

Согласно второму аспекту настоящее изобретение, кроме того, относится к выделенной нуклеиновой кислоте или набору нуклеиновых кислот, содержащим последовательность, кодирующую антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или вектору нуклеиновой кислоты, содержащему указанную нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот. Можно использовать набор нуклеиновых кислот, если антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему

изобретению содержит две или более полипептидные цепи. Альтернативно, две или более полипептидные цепи могут кодироваться одной полицистронной последовательностью нуклеиновой кислоты или могут кодироваться как один полипептид, содержащий сайты расщепления, которые позволяют разделить исходный единичный полипептид на две или более полипептидные цепи.

Согласно одному варианту осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, кодирующей антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления вектор нуклеиновой кислоты содержит указанную нуклеиновую кислоту, содержащую или состоящую из последовательности, кодирующей антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению. Как правило, указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которая может быть включена в любой подходящий вектор, такой как плазида, космида, эписома, искусственная хромосома, фаг или вирусный вектор.

Согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения. Как правило, такую клетку-хозяина трансформируют, трансдуцируют или трансфицируют нуклеиновой кислотой и/или вектором согласно второму аспекту настоящего изобретения. Клетки-хозяева, которые получают и впоследствии экспрессируют чужеродные нуклеиновые кислоты или векторы, состоящие из ДНК или РНК, в процессе трансформации или трансдукции, являются «трансформированными» или «трансдуцированными».

Согласно одному варианту осуществления клетки можно трансдуцировать с использованием способов, описанных в US 20190216852, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Согласно одному варианту осуществления нуклеиновые кислоты или набор нуклеиновых кислот согласно третьему аспекту настоящего изобретения можно использовать для получения рекомбинантного антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению в подходящей системе экспрессии.

Согласно одному варианту осуществления клетка-хозяин содержит антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения. Предпочтительно клетка-хозяин согласно настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту или вектор, как описано выше. Клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку, например, клетку млекопитающего (например, клетку

человека), дрожжей, растения, животного, гриба или водоросли, или может представлять собой прокариотическую клетку, например, бактерии или простейших. Для целей продукции антигенсвязывающего полипептида, такого как антигенсвязывающий полипептид, содержащий TCR или рекомбинантный TCR, или биспецифического антигенсвязывающего полипептида, клеткой-хозяином предпочтительно является клетка млекопитающего, такая как лимфоцит, предпочтительно Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцита. Примером предпочтительных клеток-хозяев являются CD4 или CD8-положительные Т-клетки. Предпочтительной клеткой-хозяином для рекомбинантной экспрессии являются клетки яичника китайского хомячка (CHO). Подходящими клетками-хозяевами для скрининговых анализов могут быть дрожжевые клетки.

Согласно одному варианту осуществления, клетка-хозяин содержит антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, или нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно настоящему изобретению, где указанная клетка-хозяин предпочтительно представляет собой лимфоцит, такой как Т-лимфоцит или клетка-предшественник Т-лимфоцита, предпочтительно CD4 или CD8-положительную Т-клетку. Для целей экспрессии антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению вектор экспрессии может быть любого типа, в котором ген, кодирующий первый антигенсвязывающий полипептид, такой как тяжелая цепь или альфа-цепь антитела, и ген, кодирующий второй полипептид, такой как легкая цепь или бета-цепь антитела, существует в отдельных векторах, или относится к типу, в котором оба гена существуют в одном и том же векторе (тандемный тип).

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения, или клетку-хозяин согласно третьему аспекту настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, стабилизатор и/или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот, вектора или клетки-хозяина согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция согласно четвертому аспекту настоящего изобретения содержит терапевтически эффективное количество активного ингредиента, предпочтительно антигенсвязывающего полипептида согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновую кислоту или

вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения, или клетку-хозяин согласно третьему аспекту настоящего изобретения, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя и/или вспомогательного вещества, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Согласно другому варианту осуществления фармацевтическая композиция содержит антигенсвязывающий полипептид или нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий антигенсвязывающий полипептид, или клетку-хозяина, экспрессирующую антигенсвязывающий полипептид, и фармацевтически активную композицию. Состав должен соответствовать способу введения. Для внутривенного введения предпочтительно, чтобы носитель представлял собой водный носитель. Согласно одному варианту осуществления такой водный носитель способен придавать улучшенные свойства при объединении с антигенсвязывающим полипептидом согласно настоящему изобретению, например, улучшенную растворимость, эффективность и/или улучшенную иммунотерапию.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно содержать терапевтический агент или фармакологически активное вещество, как например, без ограничения адъюванты и/или дополнительные активные ингредиенты, в фармацевтически или физиологически приемлемом составе, выбранном для надлежащего введения в соответствии с выбранным способом введения.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтические композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с пролонгированным высвобождением и т.п. Для получения фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению фармацевтически приемлемые носители могут быть твердыми или жидкими и предпочтительно являются жидкими. Композиции в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, воду, солевые растворы, водную декстрозу, растворы глицерина или растворы вода/пропиленгликоль. Для парентеральных инъекций (например, внутривенных, внутриартериальных, внутрикостных инфузий, внутримышечных, подкожных, внутрибрюшинных, внутрикожных и интратекальных инъекций) жидкие препараты могут быть приготовлены в виде раствора, например, в водном растворе полиэтиленгликоля. Солевой раствор является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция находится в стандартной лекарственной форме. В такой форме композиция может быть разделена на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Стандартная лекарственная форма может представлять собой упакованную композицию, причем упаковка содержит дискретные количества композиции, например, упакованные

таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Кроме того, стандартная лекарственная форма может представлять собой капсулу, флакон для инъекций, таблетку, пастилку или леденец сам по себе, или она может представлять собой подходящее количество любого из них в упакованной форме. Фармацевтическая композиция, если желательно, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или агентов, буферизирующих рН.

Форма фармацевтических композиций, путь введения, доза и схема лечения, естественно, зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, веса и пола пациента, желаемой продолжительности лечения и т.д. Указанная фармацевтическая композиция может находиться в любой подходящей форме в зависимости от желаемого способа введения ее пациенту.

Согласно одному варианту осуществления фармацевтические композиции согласно четвертому аспекту настоящего изобретения содержат носители, которые фармацевтически приемлемы для состава, пригодного для инъекций. Это могут быть, в частности, изотонические, стерильные солевые растворы (мононатрий- или динатрийфосфат, хлориды натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора, позволяют получить растворы для инъекций.

Для получения фармацевтических композиций эффективное количество антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению можно растворить или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии, составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля, и стерильные порошки для приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильным в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно приготовить в воде, смешанной соответствующим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно приготовить в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант, препятствующий размножению микроорганизмов.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению можно составить в фармацевтическую композицию в нейтральной форме или в форме соли с использованием фармацевтически приемлемых солей.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем включения активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются методы вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Согласно пятому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоте или вектору согласно второму аспекту настоящего изобретения, или клетке-хозяину согласно третьему аспекту настоящего изобретения, или фармацевтической композиции согласно четвертому аспекту настоящего изобретения для применения в медицине.

Согласно одному варианту осуществления указанный антигенсвязывающий полипептид, указанная нуклеиновая кислота или вектор, указанная клетка-хозяин или указанная фармацевтическая композиция предназначены для применения в медицине.

Согласно шестому аспекту настоящее изобретение относится к антигенсвязывающему полипептиду согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновой кислоте или вектору согласно второму аспекту настоящего изобретения, или клетке-хозяину согласно третьему аспекту настоящего изобретения, или фармацевтической композиции согласно четвертому аспекту настоящего изобретения для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания, предпочтительно рака, или опухоли или опухолевого заболевания и/или нарушения.

Согласно одному варианту осуществления указанный антигенсвязывающий полипептид, указанная нуклеиновая кислота или вектор, указанная клетка-хозяин или указанная фармацевтическая композиция предназначены для применения в диагностике, профилактике и/или лечении пролиферативного заболевания. Предпочтительно

пролиферативное заболевание, которое необходимо диагностировать, предотвратить и/или лечить, представляет собой рак.

Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения, нуклеиновая кислота или вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения или клетка-хозяин согласно третьему аспекту настоящего изобретения или фармацевтическая композиция согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предназначены для применения для подавления роста опухоли или лечения рака.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение может включать способы лечения пациента, страдающего раком, который презентует пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе или включенной в настоящем документе посредством ссылки, в комплексе с белком МНС, предусматривающие введение пациенту композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем документе.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение может включать способы индукции иммунного ответа у пациента, страдающего раком, который презентует пептид, состоящий из аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе, в комплексе с белком МНС, предусматривающие введение пациенту композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, описанный в настоящем документе.

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к способу улучшения стабильности и/или связывания антигенсвязывающего полипептида, где замены согласно настоящему изобретению вводят в антигенсвязывающий полипептид. В частности, способ предусматривает введение положительно заряженных аминокислот в HCDR и/или LCDR и/или введение тирозина в положение 90 тяжелой цепи согласно нумерации Кабата. В частности, способ предусматривает:

(i) замену по меньшей мере одной аминокислоты последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одной аминокислоты последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) замену по меньшей мере одной аминокислоты последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одной аминокислоты последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) замену в положении 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) замену в положении 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату на тирозин (Y), где

(1) связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3 увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом,

(2) связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3 поддерживается или увеличивается и стабильность антигенсвязывающего полипептида увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, или

(3) стабильность антигенсвязывающего полипептида увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

В частности, положение (положения) антигенсвязывающего полипептида содержит/содержат замену, как представлено выше и ниже, а также показано в прилагаемых примерах. Предпочтительно способ предусматривает замену положительно заряженной аминокислоты

в тяжелой цепи:

- (i) в положении 30,
- (ii) в положении 31,
- (iii) в положении 53,
- (iv) в положении 54, и/или

в легкой цепи:

- (i) в положении 31, и/или
- (ii) в положении 56.

В частности, способ предусматривает замену гистидина в положении 90 на тирозин в тяжелой цепи. Замену гистидина в положении 90 тирозином в тяжелой цепи можно комбинировать с дополнительными заменами в тяжелой цепи и/или легкой цепи, как представлено ниже и выше.

Согласно одному варианту осуществления способ обеспечивает антигенсвязывающие полипептиды, которые обладают повышенным связыванием, предпочтительно измеряемым путем оценки связывания, как описано в настоящем документе выше и ниже, по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим замены согласно настоящему изобретению, например, SEQ ID NO: 1 (BMA031 (V36) VH) и SEQ ID NO: 2 (BMA031 (V36) VL). Эффекты, раскрытые в

настоящем документе выше в контексте антигенсвязывающих полипептидов, также применимы к способу согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту осуществления способ согласно седьмому аспекту настоящего изобретения приводит к антигенсвязывающим полипептидам с увеличенной T_m по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, например, содержащим VH/VL согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 (V36) VH) и SEQ ID NO: 2 (BMA031 (V36) VL). Предпочтительно T_m антигенсвязывающих полипептидов увеличивается на по меньшей мере 1°C - 3°C по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, предпочтительно родительским антителом, например, содержащим VH/VL согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 (V36) VH) и SEQ ID NO: 2 (BMA031 (V36) VL). Как неожиданно было продемонстрировано в примерах, замена гистидина в положении 90 тирозином повышала стабильность по сравнению с исходным антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим указанную замену в положении 90 тирозином, например, антигенсвязывающим полипептидом, содержащим VH/VL согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 (V36) VH) и SEQ ID NO: 2 (BMA031 (V36) VL). В частности, замена гистидина в положении 90 на тирозин увеличивает стабильность на по меньшей мере приблизительно 1°C , предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 2°C , более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно $2,5^\circ\text{C}$ или даже более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 3°C , по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, не содержащим указанной замены тирозином в положении 90.

Согласно одному варианту осуществления приводит к получению антигенсвязывающих полипептидов, которые обеспечивают повышенное связывание по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, например, содержащими VH/VL согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 (V36) VH) и SEQ ID NO: 2 (BMA031 (V36) VL), и увеличенной T_m по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, предпочтительно родительским антителом, например, содержащим VH/VL согласно SEQ ID NO: 1 (BMA031 (V36) VH) и SEQ ID NO: 2 (BMA031 (V36) VL).

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает антигенсвязывающие полипептиды, где по меньшей мере одно из следующих положений тяжелой цепи 30, 31, 53 и 54 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает антигенсвязывающие полипептиды, где по меньшей мере одно из следующих положений легкой цепи 31, 56 и 93 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления способ предусматривает антигенсвязывающие полипептиды, где по меньшей мере одно из следующих положений

тяжелой цепи 30, 31, 53 и 54 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту и по меньшей мере одно из следующих положений легкой цепи 31 и 56, содержит замену на положительно заряженную аминокислоту.

Согласно одному варианту осуществления эта/эти замены/замены повышает/повышают стабильность и/или связывание антигенсвязывающего полипептида по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, который не содержит замены.

Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение относится к способу обнаружения, определения и/или обогащения клеток, таких как Т-клетки, экспрессирующих комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, предусматривающему стадию приведения клеток в контакт с антигенсвязывающим полипептидом согласно первому аспекту настоящего изобретения. Способ может дополнительно предусматривать обогащение Т-клеток, экспрессирующих комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, например, обогащение Т-клеток, которые связаны с антигенсвязывающим полипептидом. Способ обнаружения или определения клеток, экспрессирующих комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, может дополнительно предусматривать обнаружение и/или определение антигенсвязывающего полипептида, связанного с клетками. Способ может дополнительно предусматривать стадию очистки, на которой очищают клетки, связанные с антигенсвязывающим полипептидом согласно первому аспекту настоящего изобретения. Кроме того, настоящее изобретение относится к применению антигенсвязывающего полипептида согласно настоящему изобретению для обнаружения, определения и/или обогащения клеток, таких как Т-клетки, экспрессирующих комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу активации Т-клеток, где способ предусматривает контакт Т-клеток с антигенсвязывающим полипептидом согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу получения антигенсвязывающего полипептида согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Согласно одному варианту осуществления способ получения антигенсвязывающего полипептида предусматривает следующие стадии:

- a. предоставление подходящей клетки-хозяина,
- b. предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий полипептид согласно первому аспекту настоящего изобретения,
- c. введение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяин согласно третьему аспекту настоящего изобретения, и

d. экспрессия указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином,

e. необязательно выделение антигенсвязывающего полипептида.

Генетическая конструкция представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор согласно второму аспекту настоящего изобретения. Согласно одному варианту осуществления способ дополнительно предусматривает выделение и очистку антигенсвязывающего полипептида из подходящей клетки-хозяина и, необязательно, восстановление антигенсвязывающего полипептида в Т-клетке. Согласно одному варианту осуществления генетическая конструкция представляет собой экспрессирующую конструкцию, содержащую последовательность промотора, функционально связанную с указанной кодирующей последовательностью. Генетическая конструкция вводится в клетку-хозяин с использованием методов, известных в данной области техники, например трансформации, трансдукции или трансфекции. Антигенсвязывающий полипептид согласно настоящему изобретению может быть получен любым способом, известным в данной области техники, как например, без ограничения любой химической, биологический, генетический или ферментативный метод, либо отдельно, либо в комбинации.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к набору, содержащему антигенсвязывающий полипептид по любому из предыдущих пунктов.

В соответствии с указанным выше настоящее изобретение относится к следующим пунктам:

1. Антигенсвязывающий полипептид, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52,

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой A или N,

X₂ представляет собой E или Q, и/или

X₃ представляет собой Q или K

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR) 1-4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54,

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55,

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LFR) 1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) положение 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату содержит замену на остаток тирозин (Y),

и где антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3.

2. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 1, где положительно заряженные аминокислоты присутствуют:

(i) в одном или нескольких из следующих положений тяжелой цепи: 31, 53 и 54 и/или

(ii) в одном или нескольких из следующих положений легкой цепи: 31 и 56,

и где положения указаны согласно нумерации по Кабату.

3. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 1 или 2, где

(a) положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи:

(i) в положении 30 представляет собой R, K или H,

(ii) в положении 31 представляет собой R, K или H,

(iii) в положении 53 представляет собой R, K или H, и/или

(iv) в положении 54 представляет собой R или K, и/или

- (b) положительно заряженная аминокислота в легкой цепи
- (i) в положении 31 представляет собой R или K, и/или
- (ii) в положении 56 представляет собой R или K.

4. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 3, где VH и VL образуют первый сайт связывания, и где антигенсвязывающий полипептид содержит второй антигенсвязывающий сайт, предпочтительно специфически связывающийся с белком клеточной поверхности, предпочтительно белком клеточной поверхности раковой клетки, более предпочтительно специфически связывающийся с пептидным комплексом главного комплекса гистосовместимости (МНС), предпочтительно МНС I, предпочтительно специфически связывающийся с пептидным комплексом человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) и наиболее предпочтительно специфически связывающийся с пептидным комплексом человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) раковой клетки.

5. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 4, где второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере вариабельную область:

- (i) цепи α (V_α) и/или β (V_β) в TCR, или
- (ii) цепи γ (V_γ) и/или δ (V_δ) в TCR, или
- iii) легкой цепи, отличной от VL, как определено в пункте 1, и/или тяжелой цепи, отличной от VH, как определено в пункте 1.

6. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 5, где второй антигенсвязывающий сайт содержит V_α и V_β или V_γ и V_δ на двух отдельных полипептидных цепях или одной и той же полипептидной цепи..

7. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 5, где VL и VH представляют собой VL и VH антитела.

8. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 7, где первый антигенсвязывающий сайт содержит VH и VL на двух отдельных полипептидных цепях или одной и той же полипептидной цепи.

9. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1-8, где по меньшей мере одна аминокислота, которая заменена на положительно заряженную аминокислоту, присутствует:

- (1) в SEQ ID NO: 52,
- (2) в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53,
- (3) в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 54,
- (4) в SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 55,
- (5) в SEQ ID NO: 52, и SEQ ID NO: 54, и SEQ ID NO: 55,

- (6) в SEQ ID NO: 52, и SEQ ID NO: 53, и SEQ ID NO: 54,
- (7) в SEQ ID NO: 52, и SEQ ID NO: 53, и SEQ ID NO: 55,
- (8) в SEQ ID NO: 52, и SEQ ID NO: 53, и SEQ ID NO: 54, и SEQ ID NO: 55,
- (9) в SEQ ID NO: 53,
- (10) в SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54,
- (11) в SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 55,
- (12) SEQ ID NO: 53, и SEQ ID NO: 54, и SEQ ID NO: 55,
- (13) в SEQ ID NO: 54 (LCDR1),
- (14) в SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55, или
- (15) в SEQ ID NO: 55.

10. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1-9, где положительно заряженная аминокислота выбрана из группы, состоящей из аргинина (R), гистидина (H) и лизина (K), где предпочтительно положительно заряженная аминокислота представляет собой R или K.

11. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1-10, содержащий серин (S) или аспарагин (N) в положении 30 в тяжелой цепи где положения указаны согласно нумерации по Кабату.

12. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 11, где антигенсвязывающий полипептид содержит дополнительные модификации в

(i) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), предпочтительно замена на отрицательно заряженную аминокислоту, предпочтительно в положении 100a, более предпочтительно глутамат (E), и/или

(ii) CDR3 легкой цепи (LCDR3), предпочтительно замена на полярную аминокислоту, предпочтительно в положении 93, более предпочтительно аспарагином (N), причем положение указано согласно нумерации Кабата.

13. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 12, где

(i) HCDR3 имеет последовательность GSYDYX₁GFVY (SEQ ID NO: 56), где X₁ представляет собой D или E, предпочтительно E, и/или

(ii) LCDR3 имеет последовательность QQWSX₁X₂X₃LT (SEQ ID NO: 57), где X₁ представляет собой S или N, X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, D, H, S, Y и A, и X₃ представляет собой P или A, где предпочтительно LCDR3 имеет последовательность QQWSX₁NPLT (SEQ ID NO: 96), где X₁ представляет собой S или N, предпочтительно S.

14. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1-13, содержащий

(i) HFR1, HFR2 и HFR3, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), SEQ ID NO: 97 (GL1_BM_VH28_HV), SEQ ID NO: 98 (GL1_BM_VH31_HV), SEQ ID NO: 99 (HEBE1_H10_HV), SEQ ID NO: 100 (HEBE1_H66_HV), и SEQ ID NO: 101 (HEBE1_H71_HV), где предпочтительно HFR1, HFR2 и HFR3 содержатся в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), и/или

(ii) LFR1, LFR2 и LFR3, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL) или SEQ ID NO: 102 (GL1BMVK43_VL), где предпочтительно LFR1, LFR2 и LFR3 содержатся в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL), и

где необязательно антигенсвязывающий полипептид дополнительно содержит HFR4, как содержится в VH, как представлено в SEQ ID NO: 1 (BMA031 V36_VH), или LFR4, как содержится в VL, как представлено в SEQ ID NO: 2 (BMA031 V36_VL).

15. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 14, содержащий:

(i) HFR1, как представлено в SEQ ID NO 1, или человеческую последовательность HFR1, имеющую по меньшей мере приблизительно 60% идентичности последовательности с HFR1, как представлено в SEQ ID NO: 1, необязательно содержащую замену в положении 30 согласно аннотации Кабата,

(ii) HFR2, как представлено в SEQ ID NO 1, или человеческую последовательность HFR2, имеющую по меньшей мере приблизительно 75% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и

(iii) HFR3, как представлено в SEQ ID NO 10, или человеческую последовательность HFR3, имеющую по меньшей мере приблизительно 55% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, необязательно содержащую замену в положении 90 согласно аннотации Кабата.

16. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 15, где домен VL содержит:

(i) LFR1, как представлено в SEQ ID NO 2, или человеческую последовательность LFR1, имеющую по меньшей мере приблизительно 50% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2,

(ii) LFR2, как представлено в SEQ ID NO 2, или человеческую последовательность LFR2, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, и

(iii) LFR3, как представлено в SEQ ID NO 2, или человеческую последовательность LFR3, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2.

17. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 16, дополнительно содержащий

(i) HFR4, как представлено в SEQ ID NO 1 или человеческую последовательность HFR4, имеющую по меньшей мере приблизительно 90% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1, и/или

(ii) LFR4, как представлено в SEQ ID NO 1, или человеческую последовательность LFR4, имеющую по меньшей мере приблизительно 90% идентичности последовательности с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1.

18. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 17, где VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 (VH H90Y), SEQ ID NO: 9 (VH_T30N_S31R), SEQ ID NO: 10 (VH_T30S_S31R_Y53R_E100aD), SEQ ID NO: 11 (VH_S31R), SEQ ID NO: 12 (VH_T30S_Y53R), SEQ ID NO: 14 (VH_N54K_H90Y), SEQ ID NO: 15 (VH_T30N_S31N_Y53R), SEQ ID NO: 16 (VH_T30N_S31R_V56I), SEQ ID NO: 17 (VH_S31R_N54K_E100aD), SEQ ID NO: 19 (VH_T30R), SEQ ID NO: 20 (VH T30K), SEQ ID NO: 21 (VH S31K), SEQ ID NO: 22 (VH_Y53R), SEQ ID NO: 23 (VH_Y53K), SEQ ID NO: 24 (VH_N54R), SEQ ID NO: 25 (VH N54K), SEQ ID NO: 29 (VH_Y53H), SEQ ID NO: 30 (VH_S31H), SEQ ID NO: 31 (VH S31R H90Y), SEQ ID NO: 32 (VH Y53R H90Y), SEQ ID NO: 33 (VH N54R H90Y), и SEQ ID NO: 34 (VH_E61Q_H90Y), или ее вариант VH, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 31, 32, 33 и 34, соответственно, где вариант VH сохраняет соответствующую замену (замены) по сравнению с VH с последовательностью согласно SEQ ID NO: 1.

19. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 18, где VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 (VL S31R S56R), SEQ ID NO: 13 (VL S31N S56R S93N), SEQ ID NO: 18 (VL S56R), SEQ ID NO: 26 (VL_S31R), SEQ ID NO: 27 (VL_S31K), и SEQ ID NO: 28 (VL_S56K), или ее вариант VL, содержащий аминокислотную последовательность, на меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 13, 18, 26, 27 и 28, соответственно, где вариант VL сохраняет соответствующую замену (замены) по сравнению с VL с последовательностью согласно SEQ ID NO: 2.

20. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 19, где VH и VL содержат последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 18, и SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 18.

21. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1-20, где
а) треонин (Т) в положении 30 в тяжелой цепи заменен на аспарагин (N) или серин (S),

b) S в положении 31 в тяжелой цепи заменен на аспарагин (N),

c) валин (V) в положении 56 в тяжелой цепи заменен на изолейцин (I),

d) глутаминовая кислота (E) в положении 100a в тяжелой цепи заменена на аспарагиновую кислоту (D), и/или

e) S в положении 31 и/или положение 93 в легкой цепи заменен/заменены на аспарагин (N).

22. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 21, где VH и VL или V α и V β ковалентно или нековалентно связаны друг с другом.

23. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 22, дополнительно содержащий одно или более из следующего:

(i) дополнительный антигенсвязывающий сайт,

(ii) трансмембранную область, необязательно включающую цитоплазматическую сигнальную область,

(iii) диагностический агент, и/или

(iv) терапевтический агент.

24. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 23, содержащий первую и вторую полипептидные цепи, которые образуют первый и второй антигенсвязывающий сайт,

где первая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:

$$V_1-L_1-V_2-L_2-D_1 \quad [I]$$

где

V_1 представляет собой первый переменный домен,

V_2 представляет собой второй переменный домен,

L_1 и L_2 представляют собой линкеры, L_2 присутствует или отсутствует,

D_1 представляет собой домен димеризации и присутствует или отсутствует,

и где вторая полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой:

$$V_3-L_3-V_4-L_4-D_2 \quad [II]$$

где

V_3 представляет собой третий переменный домен,

V_4 представляет собой четвертый переменный домен,

L_3 и L_4 представляют собой линкеры, L_4 присутствует или отсутствует, и

D_2 представляет собой домен димеризации и присутствует или отсутствует,

где D_1 и D_2 специфически связываются друг с другом,

и где

V_1 или V_2 представляет собой V_H согласно пункту 1, и V_3 или V_4 представляет собой V_L согласно пункту 1, и

V_3 или V_4 представляет собой V_α или V_γ и V_1 или V_2 представляет собой V_β или V_δ согласно пункту 5,

или

V_1 или V_2 представляет собой V_L согласно пункту 1 и V_3 или V_4 представляет собой V_H согласно пункту 1, и

V_3 или V_4 представляет собой V_α или V_γ и V_1 или V_2 представляет собой V_β или V_δ согласно пункту 5,

или

V_1 или V_2 представляет собой V_H согласно пункту 1 и V_3 или V_4 представляет собой V_L согласно пункту 1, и

V_3 или V_4 представляет собой V_β или V_δ и V_1 или V_2 представляет собой V_α или V_γ согласно пункту 5,

или

V_1 или V_2 представляет собой V_L согласно пункту 1 и V_3 или V_4 представляет собой V_H согласно пункту 1, и

V_3 или V_4 представляет собой V_β или V_δ и V_1 или V_2 представляет собой V_α или V_γ согласно пункту 5.

25. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 24, где

- (1) V_1 представляет собой V_H ,
 V_2 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_3 представляет собой V_α или V_γ , и
 V_4 представляет собой V_L ,
- (2) V_1 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_2 представляет собой V_H ,
 V_3 представляет собой V_L , и
 V_4 представляет собой V_α или V_γ ,
- (3) V_1 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_2 представляет собой V_L ,
 V_3 представляет собой V_H , и
 V_4 представляет собой V_α или V_γ ,
- (4) V_1 представляет собой V_L ,
 V_2 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_3 представляет собой V_α или V_γ , и
 V_4 представляет собой V_H ,
- (5) V_1 представляет собой V_H ,
 V_2 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_3 представляет собой V_L , и
 V_4 представляет собой V_α или V_γ ,
- (6) V_1 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_2 представляет собой V_H ,
 V_3 представляет собой V_α или V_γ , и
 V_4 представляет собой V_L ,
- (7) V_1 представляет собой V_L ,
 V_2 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_3 представляет собой V_H , и
 V_4 представляет собой V_α или V_γ ,
- (8) V_1 представляет собой V_β или V_δ ,
 V_2 представляет собой V_L ,
 V_3 представляет собой V_α или V_γ , и
 V_4 представляет собой V_H ,
- (9) V_1 представляет собой V_H ,
 V_2 представляет собой V_L , и
 V_3 представляет собой V_α или V_γ ,

- V_4 представляет собой V_β или V_δ ,
- (10) V_1 представляет собой V_L ,
 V_2 представляет собой V_H ,
 V_3 представляет собой V_α или V_γ , и
 V_4 представляет собой V_β или V_δ ,
- (11) V_1 представляет собой V_H ,
 V_2 представляет собой V_L ,
 V_3 представляет собой V_β или V_δ , и
 V_4 представляет собой V_α или V_γ ,
- (12) V_1 представляет собой V_L ,
 V_2 представляет собой V_H ,
 V_3 представляет собой V_β или V_δ , и
 V_4 представляет собой V_α или V_γ .
26. Антигенсвязывающий полипептид согласно пункту 24 или 25, где
- (i) D1 и D2 представляют собой домены Fc,
(ii) L1 имеет длину от 1 до 30 аминокислот, и/или
(iii) L2, если присутствует, имеет длину от 1 до 30 аминокислот, и/или
(iv) L3 имеет длину от 1 до 30 аминокислот, и/или
(v) L4 имеет длину от 1 до 30 аминокислот.
27. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 24-26, где антигенсвязывающий полипептид
- (i) имеет первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 39 и имеет вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 38, или
- (ii) имеет первую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 39 и имеет вторую полипептидную цепь согласно SEQ ID NO: 35
28. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот, кодирующие антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 26, или вектор нуклеиновой кислоты, содержащий указанную нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот.
29. Рекомбинантная клетка-хозяин содержащая антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 27, или нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно пункту 28, где указанная клетка-хозяин представляет собой
- (i) лимфоцит, предпочтительно Т-лимфоцит или клетку-предшественник Т-лимфоцита, например, CD4 или CD8-положительную Т-клетку, или

(ii) клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (СНО) или дрожжевая клетка.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 27, нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно пункту 28, или клетка-хозяин согласно пункту 29, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, стабилизатор и/или вспомогательное вещество.

31. Способ получения антигенсвязывающего полипептида согласно любому из пунктов 1 - 27, включающий

(i) предоставление подходящей клетки-хозяина,

(ii) предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антигенсвязывающий полипептид по любому из пунктов 1 - 22,

(iii) введение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяин, и

(iv) экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.

32. Способ согласно пункту 31, дополнительно предусматривающий выделение и очистку антигенсвязывающего полипептида из подходящей клетки-хозяина и необязательно восстановление антигенсвязывающего полипептида в Т-клетке.

33. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 27, нуклеиновая кислота, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно пункту 28, клетка-хозяин согласно пункту 29, или фармацевтическая композиция согласно пункту 30, для применения в медицине.

34. Антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1 - 27, нуклеиновая кислота, или набор нуклеиновых кислот, или вектор согласно пункту 28, клетка-хозяин согласно пункту 29, или фармацевтическая композиция согласно пункту 30 для применения для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания, предпочтительно рака.

35. Способ улучшения или поддержания связывания и/или улучшения стабильности антигенсвязывающего полипептида, содержащего переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52,

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой A или N,

X₂ представляет собой E или Q, и/или

X₃ представляет собой Q или K

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR) 1 -4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54,

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55,

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LCR) 1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) положение 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату содержит замену на остаток тирозин (Y),

где

(1) связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3 увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом,

(2) связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3 поддерживается или увеличивается и стабильность

антигенсвязывающего полипептида увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, или

(3) стабильность антигенсвязывающего полипептида увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

36. Способ согласно пункту 35, где

(i) по меньшей мере одно из следующих положений тяжелой цепи 31, 53 и 54 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту,

и/или

(ii) по меньшей мере одно из следующих положений легкой цепи 31 и 56 содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, причем положения соответствуют нумерации Кабата.

37. Способ согласно пункту 35, где замена (замены) увеличивает (увеличивают) стабильность и/или связывание антигенсвязывающего полипептида по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, который не содержит замен на положительно заряженную аминокислоту в положениях 30, 31, 53 и/или 54 в тяжелой цепи, замены на положительно заряженную аминокислоту в положениях 31 и/или 56 в легкой цепи и/или замену на тирозин (Y) в положении 90 в тяжелой цепи.

38. Способ согласно любому из предыдущих пунктов, где замена в положении 90 в HFR3 остатком тирозина (Y) согласно нумерации Кабата увеличивает стабильность по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

39. Способ обнаружения, определения и обогащения Т-клеток, экспрессирующих комплекс TCR $\alpha/\beta/CD3$, предусматривающий стадию контакта клеток с антигенсвязывающим полипептидом согласно любому из пунктов 1-27.

40. Набор, содержащий антигенсвязывающий полипептид согласно любому из пунктов 1-27.

Термин «приблизительно» относится в контексте настоящего изобретения и при использовании по отношению к конкретному указанному числовому значению к значению и означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 5%, не более чем на 4,5%, 4,0%, 3,5%, 3,0%, 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,0% или 0,5%. Например, в настоящем документе выражение «приблизительно 100» включает 95 и 105 и все значения между ними (например, 95,0, 95,5, 96,0, 96,5, 97,0, 97,5, 98,0, 98,5, 99,0, 99,5, 100,5, 101,0, 101,5, 102,0, 102,5, 103,0, 103,5, 104,0, 104,5 и 105,0).

В настоящей заявке термин «и/или» представляет собой грамматический союз, который следует интерпретировать как охватывающий возможность возникновения одного или нескольких случаев, которые он соединяет. Например, формулировка «такие белки с

нативной последовательностью могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных и/или синтетических методов» означает, что белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных и синтетических методов или белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методов или белки с нативной последовательностью могут быть получены с использованием синтетических методов.

Кроме того, в настоящей заявке термин «содержащий» следует интерпретировать как охватывающий все конкретно упомянутые признаки, а также необязательные, дополнительные, неуказанные. В настоящем документе использование термина «содержащий» также раскрывает вариант осуществления, в котором отсутствуют какие-либо признаки, кроме конкретно упомянутых признаков (т.е. «состоящий из»).

Более того, форма единственного числа не исключает множественное число. Сам факт того, что определенные меры перечисляются во взаимно различных зависимых пунктах формулы изобретения, не означает, что комбинация этих мер не может быть использована с преимуществом.

Следующие примеры служат лишь иллюстрацией настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения, указанный прилагаемой формулой изобретения.

Примеры

Пример 1

Для того, чтобы получить антигенсвязывающие полипептиды, которые обладают повышенной стабильностью и/или повышенной аффинностью связывания, переменные цепи антитела ВМА031 (V36) (TRP-1374, Fab-фрагмент) превращали в scFv (SEQ ID NO: 44) и синтезировали соответствующую ДНК. Мутации в CDR вводили с помощью ПЦР с перекрытием и удлинением с использованием вырожденных праймеров в положениях 28 - 31, 33, 50, 52, 53, 54, 56, 58 и 96 - 100b переменной области тяжелой цепи и/или положениях 27, 29, 49, 50, 53, 55, 56, 91-94 и 96 переменной легкой цепи. Полученные нити ДНК лигировали с фагмидным вектором на основе pHAL и трансформировали в *E.coli* TG1 для генерации фагов, несущих scFv, по существу, как описано Unkauf *et al.* 2018. Полученные фаговые частицы использовали для стратегии селекции, включающей стадию негативной селекции сначала с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -отрицательными Т-клетками Jurkat (J.RT3T3.5), а затем позитивную селекцию с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительной Т-клеточной линией Jurkat (Jurkat, клон Е6-1) в течение 2 раундов селекции, по существу, как описано в

Wenzel et al. 2020. TCR $\alpha/\beta/CD3$ -отрицательные Т-клетки Jurkat J.RT3T3.5 получены из клеток Jurkat посредством облучения и потеряли презентацию своего комплекса TCR $\alpha/\beta/CD3$, сохраняя при этом экспрессию других поверхностных белков на неразличимых уровнях (Weiss and Stobo 1984). После переноса бета-цепи TCR и, следовательно, экспрессии комплекса TCR/CD3 на поверхности клеточная линия J.RT3T3.5 восстанавливает свою функциональность (Ohashi *et al.*, 1985). Таким образом, эта клеточная линия считается хорошим инструментом для негативной селекции связующего комплекса TCR $\alpha/\beta/CD3$. Конечные клоны трансдуцировали в *E.coli* XL1 для проточного цитометрического анализа растворимых молекул scFv. Все клоны анализировали на связывание как с клеточными линиями Jurkat, так и с 11 уникальными клонами с улучшенным связыванием (SEQ ID NO: 45 - 55) с сохраненной специфичностью (связывание с Jurkat, клоном E6-1, но не с J.RT3T3.5, фиг. 1), превращали в формат Fab (в настоящем документе также называемый фрагментом Fab) для дальнейшего исследования свойств связывания, а также оценки стабильности. Фрагмент Fab содержал соответствующие VL-CL и VH-CH1, соединенные дисульфидным мостиком. Аминокислотная последовательность CH1 показана в SEQ ID NO: 3. Аминокислотная последовательность CL показана в SEQ ID NO: 4. Типичный фрагмент Fab родительского антигенсвязывающего полипептида (TPP1374 – фрагмент Fab BMA031(V36)) показан в SEQ ID NO: 5 и 6. Антигенсвязывающие полипептиды, протестированные ниже в формате Fab, также содержали CL и CH1, как показано в SEQ ID NO: 5 и 6. Кроме того, к С-концу CH1 для очистки и обнаружения фрагментов Fab добавляли метку His. Другими словами, протестированные замены были введены в иллюстративное родительское антитело. Помимо вставленных мутаций CDR (включая положение 30 в VH по Кабату), из scFv-фаговых библиотек также выбирали незапланированную каркасную мутацию, а именно H90Y в каркасе 3 тяжелой цепи (HFR3). Нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации Кабата, если не указано иное. Выбранные переменные домены перетасовывали и клонировали в вектор экспрессии Fab на основе pCSE и трансфицировали в клетки HEK293 для временной экспрессии растворимого белка (TPP-1357 - TPP-1373), всегда в сопровождении с иллюстративным родительским антителом (TPP-1374), по существу как описано в Jäger *et al.* 2013. Белки очищали из супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованными металлами, по существу, как описано в Siegemund *et al.* 2014.

Свойства связывания исследовали с помощью проточно-цитометрического анализа связывания с использованием описанных выше TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительных (и γ/δ -отрицательных) и -отрицательных клеточных линий Jurkat и применения серии титрования

очищенных фрагментов Fab (концентрации от 10 мкг/мл до 10 нг/мл с полулогарифмическим шагом). Кратко, все стадии цитометрии выполняли в буфере FACS (PBS, 2 mM EDTA, 5% FCS). Антиген-отрицательные клетки J.RT3T3.5 метили CFSE CellTrace (ThermoFisher, C34554) в соответствии с руководством и смешивали с антиген-положительными клетками Jurkat, клон E6-1, в соотношении 1:1. После этого клетки один раз промывали в буфере FACS посредством центрифугирования при 300 ОСЦ. Серию разведений представляющего интерес антитела Fab (100 мкл/лунка и концентрация, указанная выше) затем инкубировали со смесью клеток (100 000 клеток/лунка) в течение 15 минут на льду в буфере FACS. Несвязавшееся антитело смывали за одну стадию промывки буфером FACS. Для обнаружения связывания антитела против HIS-метки Alexa647 (Biolegend, 652513) использовали в разведении 1:2000 (50 мкл/лунку) в течение 15 мин на льду (в темноте) в буфере FACS. Несвязавшееся вторично окрашивающее антитело удаляли посредством трех стадий промывания буфером FACS посредством центрифугирования при 300 ОСЦ. После промывания клетки ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 1×пропидиумид (Roth, CN74.1) (40 мкл/лунка) для окрашивания живых/мертвых клеток. Наконец, окрашивание клеток определяли с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener (Sartorius AG) или CytoFLEX (Beckmann Coulter, 2089495-01)) и сравнивали значения MFI (средняя интенсивность флуоресценции). Для живых клеток (отрицательное окрашивание пропидиумидом), которые являются антиген-положительными (отрицательное окрашивание CFSE CellTrace), площадь связывания под кривой (AUC связывания) рассчитывали с использованием MFI и логарифмизированных значений концентрации. Все выбранные варианты демонстрируют повышенные значения AUC связывания по сравнению с иллюстративным родительским антителом TPP-1374 (фиг. 2). В то же время целевую специфичность оценивали путем проведения того же анализа на TCR/CD3-отрицательных клетках Jurkat. Все фрагменты Fab не показали связывания (фиг. 3).

Стабильность фрагментов Fab исследовали с помощью nanoDSF с использованием системы Prometheus NT.48, рассчитывая температуры плавления фрагментов Fab, когда 50% белка развернуто (таблица 3). Все измерения проводили в PBS с pH 7,4 при концентрации Fab 50 мкг/мл и скорости нагревания 1°C/мин. Оценку температуры плавления проводили с помощью PR.StabilityAnalysis (v. PR.StabilityAnalysis_x64_1.1.0.11077). Значения Delta Tm рассчитывали только для вариантов, которые проводили в рамках одного эксперимента. При 71,8°C исходный фрагмент Fab VMA031 (V36) уже продемонстрировал высокую стабильность, и, за исключением TPP-1366, все остальные белки могли сохранять свою стабильность выше

температуры плавления 70°C. Различные замены еще больше улучшали стабильность по сравнению с фрагментом Fab ВМА031 (V36), см. Таблицу 3. Неожиданно мутация Н90Y (согласно нумерации Кабата) в тяжелой цепи обеспечила огромный прирост температурной стабильности со сдвигом значительно выше 75°C (см. Таблицу 3).

Таблица 3. Температура плавления созревших молекул Fab. Температуру плавления очищенных Fab-фрагментов определяли с помощью nanoDSF. TPP-1374 служил эталонной молекулой

Молекула	Мутации	T _m [°C]
TPP-1357	VH_H90Y_VL_S31R_S56R	76,8
TPP-1358	VH_T30N_S31R_VL_wt	71,4
TPP-1359	VH_T30S_S31R_Y53R_E100aD_VL_wt	70,1
TPP-1361	VH_T30S_Y53R_VL_wt	71,9
TPP-1362	VH_S31R_VL_LS31N_S56R_S93N	71,6
TPP-1364	VH_T30N_S31N_Y53R_VL_wt	71,9
TPP-1365	VH_T30N_S31R_V56I_VL_wt	70,7
TPP-1366	VH_S31R_N54K_E100aD_VL_wt	67,6
TPP-1368	VH_S31R_VL_S56R	72,1
TPP-1369	VH_S31R_VL_S31R_S56R	72,9
TPP-1370	VH_T30S_Y53R_VL_S56R	71,7
TPP-1371	VH_T30S_Y53R_VL_S31R_S56R	72,5
TPP-1373	VH_N54K_H90Y_VL_S31R_S56R	76,6
TPP-1374	VH_wt_VL_wt	71,8

Пример 2

Комбинации замен, выбранных в примере 1, были введены в иллюстративное родительское антитело (TPP-1374). Несколько положений в CDR 1 и 2 тяжелой цепи и легкой цепи были заменены положительно заряженными аминокислотами (основными аминокислотами). В первом эксперименте использовали только одну основную аминокислоту на цепь. Кроме того, в выбранные варианты вводили каркасную мутацию Н90Y. Фрагменты Fab TPP-1360, TPP-1363, TPP-1372, TPP-1374-TPP-1384 и TPP-1387-TPP-1393 получали, очищали и анализировали, как показано в примере 1, на предмет АУС связывания и температуры плавления. Кроме того, ЕС50 связывания исследовали путем аппроксимации MFI нелинейной 4-точечной кривой, см. фиг. 6. Замена в положении 30

тяжелой цепи на основные аминокислоты (например, R или K) привела к улучшению EC50 связывания с целевыми клетками Jurkat, клона E6-1, по сравнению с эталонным VMA031 (V36) Fab (TRP -1374) (Таблица 4, Таблица 7, фиг. 5). Замена серина в положении 31 тяжелой цепи на аргинин или лизин улучшала EC50 связывания во всех протестированных вариантах по сравнению с родительским Fab VMA031 (V36) (Таблица 4, Таблица 6, Таблица 4, фиг. 5). Все протестированные варианты с замененным остатком аспарагина в положении 54 тяжелой цепи продемонстрировали улучшенные свойства связывания по сравнению с Fab VMA031 (V36) (таблица 4, таблица 6, таблица 7, фиг. 5).

Замена тирозина на аргинин в положении 53 тяжелой цепи улучшила AUC связывания по сравнению с VMA031 (V36) Fab (Таблица 4 и 6).

В легкой цепи замена положительным зарядом в положении 56 усиливает связывание (Таблица 4, Таблица 7, фиг. 5).

Замена серина в положении 31 легкой цепи на положительный заряд обеспечивала снижение связывания и одновременно повышала стабильность (таблица 4, фиг. 5).

Неожиданно введение H90Y в тяжелую цепь увеличило температуру плавления более чем на 3°C до минимального уровня в 75°C (за исключением VH_N54K_H90Y_VL_S56R (TRP-1372), где увеличение температуры плавления произошло на 2,8°C). Иллюстративные фрагменты Fab VH_H90Y, VL_S31R_S56R и VH_N54K_H90Y_VL_S31R_S56R повышали температуру плавления даже более чем на 4°C (сравните Таблицу 4 и Таблицу 5, Таблицу 6, фиг. 5).

Кроме того, комбинация H90Y с заменой аргинином в положениях 31, 53 и 54 тяжелой цепи (TRP-1388, TRP-1390 и TRP-1391) дает синергетический эффект в отношении AUC связывания. Этот синергетический эффект на AUC связывания был также обнаружен для дополнительной комбинации молекул VH_S31R и VH_Y53R с аргинином в положении 56 легкой цепи (TRP-1389 и TRP-1392), что привело к самым высоким значениям AUC связывания (таблица 6, фиг. 5). Огромный эффект на связывание комбинации этих одиночных мутаций также можно отобразить с помощью улучшенных кривых связывания и значений EC50 (таблица 7, фиг. 6).

Специфичность фрагментов Fab снова оценивали с помощью проточного цитометрического анализа клеток J.RT3T3.5, как в примере 1. Ни один из исследованных белков не продемонстрировал какой-либо перекрестной реактивности к этой TCR/CD3-отрицательной клеточной линии, при этом связывание с клеточной линией-мишенью присутствовало для всех вариантов (фиг. 4).

Таблица 4. Характеристики созревших молекул Fab (только мутации CDR).

Связывание очищенных Fab-фрагментов с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительными клетками Jurkat (клон Е6-1) исследовали в серии титрования в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Площадь под кривой рассчитывали для значений MFI и соответствующих логарифмированных концентраций. Показаны процентное увеличение AUC связывания, а также разница в температуре плавления по сравнению с VH_wt_VL_wt (TPP-1374).

Молекула	Мутации	% увеличения AUC связывания	дельта Tm [°C]	Tm [°C]
TPP-1375	VH_T30R_VL_wt	87	-1,6	70,9
TPP-1376	VH_T30K_VL_wt	83	-1,8	70,7
TPP-1360	VH_S31R_VL_wt	144	0,0	72,4
TPP-1377	VH_S31K_VL_wt	56	0,8	73,3
TPP-1378	VH_Y53R_VL_wt	79	n.d.	n.d.
TPP-1379	VH_Y53K_VL_wt	1	1,0	73,5
TPP-1380	VH_N54R_VL_wt	18	-3,3	69,2
TPP-1381	VH_N54K_VL_wt	98	-3,0	69,5
TPP-1382	VH_wt_VL_S31R	-66	1,2	73,7
TPP-1383	VH_wt_VL_S31K	-73	1,0	73,4
TPP-1367	VH_wt_VL_S56R	220	-0,6	71,9
TPP-1384	VH_wt_VL_S56K	203	-0,1	72,3
TPP-1374	VH_wt_VL_wt	0	0,0	72,5

Таблица 5. Характеристики созревших молекул Fab (варианты, включающие мутацию каркаса тяжелой цепи H90Y). Связывание очищенных Fab-фрагментов с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительными клетками Jurkat (клон Е6-1) исследовали в серии титрования в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Площадь под кривой рассчитывали для значений MFI и соответствующих логарифмированных концентраций. Показан процент увеличения AUC связывания, а также разница в температуре плавления по сравнению с VH_wt_VL_wt (TPP-1374).

Молекула	Мутации	% увеличения AUC связывания	дельта Tm [°C]	Tm [°C]
TPP-1389	VH_S31R_H90Y_VL_S56R	423	3,6	76,0
TPP-1388	VH_S31R_H90Y_VL_wt	273	3,9	76,4

TPP-1392	VH_Y53R_H90Y_VL_S56R	813	3,6	76,1
TPP-1390	VH_Y53R_H90Y_VL_wt	270	4,4	76,9
TPP-1391	VH_N54R_H90Y_VL_wt	245	3,3	75,8
TPP-1372	VH_N54K_H90Y_VL_S56R	246	2,8	75,3
TPP-1363	VH_N54K_H90Y_VL_wt	380	3,4	75,9
TPP-1393	VH_H90Y_VL_S56R	226	3,2	75,7
TPP-1387	VH_H90Y_VL_wt	14	3,9	76,4

Таблица 6. Характеристики созревших молекул Fab (прямое сравнение конкретных мутаций). Связывание очищенных Fab-фрагментов с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительными клетками Jurkat (клон Е6-1) исследовали в серии титрования в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Площадь под кривой рассчитывали для значений MFI и соответствующих логарифмированных концентраций. Показаны процентное увеличение AUC связывания, а также разница в температуре плавления по сравнению с VH_wt_VL_wt (TPP-1374).

Молекула	Мутации	% увеличения AUC связывания	дельта Tm [°C]	Tm [°C]
TPP-1360	VH_S31R_VL_wt	144	0,0	72,4
TPP-1388	VH_S31R_H90Y_VL_wt	273	3,9	76,4
TPP-1389	VH_S31R_H90Y_VL_S56R	423	3,6	76,0
TPP-1378	VH_Y53R_VL_wt	79	n.d.	n.d.
TPP-1390	VH_Y53R_H90Y_VL_wt	270	4,4	76,9
TPP-1392	VH_Y53R_H90Y_VL_S56R	813	3,6	76,1
TPP-1380	VH_N54R_VL_wt	18	-3,3	69,2
TPP-1391	VH_N54R_H90Y_VL_wt	245	3,3	75,8
TPP-1367	VH_wt_VL_S56R	220	-0,6	71,9
TPP-1393	VH_H90Y_VL_S56R	226	3,2	75,7
TPP-1374	VH_wt_VL_wt	0	0,0	72,5
TPP-1387	VH_H90Y_VL_wt	14	3,9	76,4

Таблица 7. EC50 связывания созревших молекул Fab. Связывание очищенных Fab-фрагментов с TCR $\alpha/\beta/CD3$ -положительными клетками Jurkat (клон E6-1) исследовали в серии титрования в диапазоне от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Рассчитывали EC50 средней интенсивности флуоресценции (MFI) и показывали кратное уменьшение по сравнению с VH_wt_VL_wt (TPP-1374).

Молекула	Мутации	Кратность снижения EC50
TPP-1389	VH_S31R_H90Y_VL_S56R	31,8
TPP-1372	VH_N54K_H90Y_VL_S56R	21,5
TPP-1392	VH_Y53R_H90Y_VL_S56R	16,6
TPP-1393	VH_H90Y_VL_S56R	13,9
TPP-1367	VH_wt_VL_S56R	8,8
TPP-1381	VH_N54K_VL_wt	8,2
TPP-1388	VH_S31R_H90Y_VL_wt	8,1
TPP-1363	VH_N54K_H90Y_VL_wt	7,3
TPP-1360	VH_S31R_VL_wt	5,7
TPP-1390	VH_Y53R_H90Y_VL_wt	5,5
TPP-1391	VH_N54R_H90Y_VL_wt	4,7
TPP-1384	VH_wt_VL_S56K	4,1
TPP-1377	VH_S31K_VL_wt	4,1
TPP-1387	VH_H90Y_VL_wt	3,2
TPP-1380	VH_N54R_VL_wt	2,9
TPP-1376	VH_T30K_VL_wt	2,8
TPP-1375	VH_T30R_VL_wt	2,1

Пример 3. Отобранные варианты (TPP-226 (PPB-1156), TPP-894 (PPB-1155), TPP-879 (PPB-1152))

Для того, чтобы исследовать, улучшают ли наблюдаемые положительные эффекты модифицированных молекул BMA031 свойства биспецифических антигенсвязывающих полипептидов, были сконструированы молекулы TCER®, содержащие модифицированные молекулы BMA031 согласно настоящему изобретению. Таким образом, путем генного синтеза получали ДНК-последовательности, кодирующие VH и VL, полученные из оптимизированных вариантов BMA031(V36) и Valpha и Vbeta, а также последовательности, кодирующие линкеры. Векторы для экспрессии рекомбинантных белков конструировали как моноцистронные, контролируемые промоторными элементами HCMV,

происходящими из pUC19. Плазмидную ДНК амплифицировали в *E.coli* стандартными методами культивирования и затем очищали с использованием коммерческих наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для временной трансфекции клеток CHO. Трансфицированные CHO-клетки культивировали в течение 10-11 дней при температуре от 32°C до 37°C. Кондиционированный клеточный супернатант очищали фильтрованием (0,22 мкм) с использованием Sartoclear Dynamics® Lab Filter Aid (Sartorius). Биспецифические молекулы очищали с использованием системы Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences), оборудованной для проведения поточной аффинной и эксклюзионной хроматографии. Аффинную хроматографию проводили на колонках с белком L (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами аффинной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию проводили непосредственно после элюирования (рН 2,8) из аффинной колонки для получения мономерного белка высокой чистоты с использованием колонок Superdex 200 pg 16/600 (GE Lifesciences) в соответствии со стандартными протоколами. Концентрации белка определяли с помощью системы NanoDrop (Thermo Scientific) с использованием расчетных коэффициентов экстинкции в соответствии с предсказанными белковыми последовательностями. При необходимости концентрацию корректировали с помощью устройств Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили в фосфатно-солевом буфере в концентрации приблизительно 1 мг/мл при температуре 2–8°C. Качество очищенных биспецифических молекул контролировали с помощью ВЭЖХ-SEC на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 4×300 мм), работающих в 50 мМ фосфате натрия, рН 6,8, содержащем 300 мМ NaCl, в системе Vanquish uHPLC. Эффективность улучшенных вариантов ВМА031 оценивали с помощью анализов высвобождения LDH. Таким образом, в качестве мишеней для РВМС, полученных от здоровых HLA-A*02-положительных доноров, использовали линии опухолевых клеток, презентующие различные уровни целевого рHLA на поверхности клеток, а также целевые рHLA-отрицательные линии опухолевых клеток (Е:Т = 10: 1) при повышении концентрации молекул TCER. Цитолиз, индуцированный TCER, количественно оценивали через 48 часов путем измерения высвобожденной LDH. Значения EC50 кривых зависимости ответа от дозы рассчитывали с использованием нелинейной аппроксимации 4-точечной кривой. Результаты двух независимых анализов с использованием РВМС двух независимых доноров показаны на фиг. 7 и фиг. 8, соответственно. Рассчитанные значения EC50 для соответствующих нелинейных кривых суммированы в таблице 8. Эти результаты показывают, что использование модифицированных молекул ВМА031 (TRP-879, TRP-894) в каркасе TCER® приводит к увеличению эффективности опосредованного Т-клетками уничтожения целевых рHLA-положительных линий опухолевых клеток по сравнению с

TRP-226, содержащими VH согласно SEQ ID NO: 1 и VL согласно SEQ ID NO: 2 BMA031 (V36). Эти результаты также показывают отсутствие или лишь незначительное увеличение опосредованной Т-клетками цитотоксичности по отношению к целевой рHLA-отрицательной опухолевой клеточной линии T98G, индуцированной оптимизированными рекрутирующими доменами.

Таблица 8. Обобщение значений EC50 опосредованной Т-клетками цитотоксичности, индуцированной молекулой TCER

	Hs695T EC50 (nM)		U2OS EC50 (nM)		T98G EC50 (nM)	
	<i>HBC-1005</i>	<i>HBC-1039</i>	<i>HBC-1005</i>	<i>HBC-1039</i>	<i>HBC-1005</i>	<i>HBC-1039</i>
РВМС-Донорная молекула						
TRP-226	340	3204	999	9099	42211	1255220
TRP-879	60	489	168	535	108513	612709
TRP-894	100	636	193	920	16480	349590

В настоящем документе представлены иллюстративные ссылки, причем эти ссылки включены в настоящий документ во всей своей полноте..

Jäger V, Büssow K, Wagner A, Weber S, Hust M, Frenzel A, Schirrmann T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. BMC Biotechnol. 2013 Jun 26;13:52. doi: 10.1186/1472-6750-13-52. PMID: 23802841

Ohashi PS, Mak TW, Van den Elsen P, Yanagi Y, Yoshikai Y, Calman AF, Terhorst C, Stobo JD, Weiss A. Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. Nature. 1985 Aug 15-21;316(6029):606-9. doi: 10.1038/316606a0. PMID: 4033759.

Siegemund M, Richter F, Seifert O, Unverdorben F, Kontermann RE. Expression and purification of recombinant antibody formats and antibody fusion proteins. Methods Mol Biol. 2014;1131:273-95. doi: 10.1007/978-1-62703-992-5_18. PMID: 24515473.

Unkauf T, Hust M, Frenzel A. Antibody Affinity and Stability Maturation by Error-Prone PCR. Methods Mol Biol. 2018;1701:393-407. doi: 10.1007/978-1-4939-7447-4_22. PMID: 29116518.

Weiss A, Stobo JD. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. J Exp Med. 1984 Nov 1;160(5):1284-99. doi: 10.1084/jem.160.5.1284. PMID: 6208306, PMCID: PMC2187507.

Wenzel EV, Roth KDR, Russo G, Fühner V, Helmsing S, Frenzel A, Hust M. Antibody Phage Display: Antibody Selection in Solution Using Biotinylated Antigens. Methods Mol Biol. 2020;2070:143-155. doi: 10.1007/978-1-4939-9853-1_8. PMID: 31625094.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO:	Описание		Последовательность
1	VH	TPP-1374, TPP-1367, TPP-1382, TPP-1383, TPP-1384, TPP-667, TPP-226	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
2	VL	TPP- 1374, TPP- 1358, TPP- 1359, TPP- 1360, TPP- 1361, TPP- 1363, TPP- 1364, TPP- 1365, TPP- 1366, TPP- 1375, TPP- 1376, TPP- 1377, TPP- 1378, TPP- 1379, TPP- 1380, TPP- 1381, TPP- 1385, TPP- 1386, TPP- 1387, TPP- 1388, TPP- 1390, TPP- 1391, TPP-	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHW YQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK

		666, TPP- 669, TPP- 879, TPP- 894, TPP- 226, TPP- 876, TPP- 891, TPP- 1292, TPP- 1293, TPP- 1294, TPP- 1295	
3	CH1 (все Fab)		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CGSGHHHHHH
4	CL (все Fab)		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
5	Тяжелая	TPP-1374	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGSGHHHH HH
6	легкая	TPP-1374	QIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSATSSVSYMHW YQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

7	VH	TPP-1357, TPP-1387, TPP-1393	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
8	VL	TPP-1357, TPP-1369, TPP-1371, TPP-1373	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVRYMHW YQQKPKGKAPKRWIYDTSKLARGVPSRFSGSGS TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK
9	VH	TPP-1358	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFNRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
10	VH	TPP-1359	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFSRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYDGFVYWGQGLVTVSS
11	VH	TPP-1360, TPP-1362, TPP-1368, TPP-1369, TPP-666, TPP-668, TPP-879, TPP-876	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
12	VH	TPP-1361, TPP-1370, TPP-1371	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFSSYV MHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEKF QGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYCA RGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
13	VL	TPP-1362	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVNYMH WYQQKPKGKAPKRWIYDTSKLARGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSNNPLTFGG GTKVEIK

14	VH	TPP-1363, TPP-1372, TPP-1373	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYKDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
15	VH	TPP-1364	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFNNY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
16	VH	TPP-1365	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFNRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDITKYAEKF QGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYCA RGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
17	VH	TPP-1366	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYKDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYDGFVYWGQGLVTVSS
18	VL	TPP-1367, TPP-1368, TPP-1370, TPP-1372, TPP-1389, TPP-1392, TPP-1393, TPP-667, TPP-668, TPP-670	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHW YQQKPGKAPKRWIYDTSKLARGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK
19	VH	TPP-1375	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFRSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
20	VH	TPP-1376	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFKSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS

21	VH	TPP-1377	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYKFTKY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
22	VH	TPP-1378, TPP-669, TPP-670, TPP-894, TPP-891	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
23	VH	TPP-1379	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPKNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
24	VH	TPP-1380	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYRDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
25	VH	TPP-1381	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYKDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSS
26	VL	TPP-1382	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVRYMHW YQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK
27	VL	TPP-1383	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVKYMH WYQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGG GTKVEIK
28	VL	TPP-1384	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHW YQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIK

29	VH	TPP-1385	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPHNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGTLVTVSS
30	VH	TPP-1386	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTHY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGTLVTVSS
31	VH	TPP-1388, TPP-1389, TPP-1292	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGTLVTVSS
32	VH	TPP-1390, TPP-1392, TPP-1293, TPP-1294, TPP-1295	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGTLVTVSS
33	VH	TPP-1391	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYRDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGTLVTVSS
34	VH	TPP-1394	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAQK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYDGFVYWGQGTLVTVSS
35	TCER цепь2	TPP-666, TPP-879	ILNVEQSPQSLHVQEGDSTKFTCSFPVKEFQDLH WYRKETAKSPEFLFYFGPYGKEKKKGRISATLN TKEGYSYLYITDSQPEDSATYLCALYNNYDMRF GAGTRLTVKPGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYKFTRYVMHWVRQAPGQGL EWMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTST AYMELSSLRSEDNAVHYCARGSYDYEGFVYW GGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK

			FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA KGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSP
36	TCER цепь 2	TPP-1294, TPP-1295	ILNVEQSPQSLHVQEGDSTKFTCSFPVKEFQDLH WYRKETAKSPEFLFYFGPYGKEKKKGRISATLN TKEGYSYLYITDSQPEDSATYLCALYNNYDMRF GAGTRLTVKPGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVRQAPGQGLE WMGYINPRNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTA YMELSSLRSEDТАVYYCARGSYDYEGFVYWG QGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
37	TCER цепь2	TPP-667, TPP-226	ILNVEQSPQSLHVQEGDSTKFTCSFPVKEFQDLH WYRKETAKSPEFLFYFGPYGKEKKKGRISATLN TKEGYSYLYITDSQPEDSATYLCALYNNYDMRF GAGTRLTVKPGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVRQAPGQGLE WMGYINPYNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTA YMELSSLRSEDТАVHYCARGSYDYEGFVYWG QGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS

			KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSP
38	TCER цепь2	TPP-669, TPP-894	ILNVEQSPQSLHVQEGDSTKFTCSFPVKEFQDLH WYRKETAKSPEFLFYFGPYGKEKKKGRISATLN TKEGYSYLYITDSQPEDSATYLCALYNNDYDMRF GAGTRLTVKPGGGSGGGGEVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVRQAPGQGLE WMGYINPRNDVTKYAEKFQGRVTLTSDTSTSTA YMELSSLRSEDTAHYCARGSYDYEGFVYWG QGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKF NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVSVLV VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVV KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSP
39	TCER цепь1	TPP-226, TPP-879, TPP-894, TPP-1295	QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSATSSVSYMHW YQKPKGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIKGGGSGGGGGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHNSLFWYRETPMQGLELLIYFQNTAVID DSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVY FCASSPGATDKQYFGPGTRLTVLEPKSSDKTHTC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

			<p>QYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP</p>
40	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHYQKPKGAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>
41	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVRYMHYQKPKGAPKRWIYDTSKLARG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>
42	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFNRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHYQKPKGAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>

43	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFSRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYDGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHWYQQKPKGAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>
44	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHWYQQKPKGAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>
45	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFSSYV MHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEKF QGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYCA RGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGGS EGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA TSSVSYMHWYQQKPKGAPKRWIYDTSKLAGSV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWS SNPLTFGGGTKVEIK</p>
46	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVNYMHWYQQKPKGAPKRWIYDTSKLARG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SNNPLTFGGGTKVEIK</p>

47	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYKDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>
48	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFNNY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>
49	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFNRVY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDITKYAEKF QGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYCA RGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGGS EGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA TSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGSV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQWS SNPLTFGGGTKVEIK</p>
50	scFv		<p>EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTRY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYKDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVHYC ARGSYDYDGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCS ATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLAGS VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK</p>

51	scFv		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSGGGSEGGG SEGGGSEGGGQIQMTQSPSSLSASVGDRTITCS ATSSVSYMHWYQQKPKGKAPKRWIYDTSKLARG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYCQQW SSNPLTFGGGTKVEIK
52	HCDR1 Кабат		SYVMH
53	HCDR2 Кабат		YINPYNDVTKYX ₁ X ₂ KFX ₃ G, X ₁ представляет собой А или N, X ₂ представляет собой Е или Q, и/или X ₃ представляет собой Q или К
54	LCDR1		SATSSVSYMH
55	LCDR2		DTSKLAS
56	HCDR3 Кабат		GSYYDYX ₁ GFVY, где X ₁ представляет собой D или E
57	LCDR3 Кабат		QQWSX ₁ X ₂ X ₃ LT, где X ₁ представляет собой S или N, X ₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, D, H, S, Y, A и N, и X ₃ представляет собой P или A
58	VH BMA03	VH гуманизованное BMA031 Shearman <i>et al.</i>	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYV MHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFK GKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCAR GSYYDYDGFVYWGQGLVTVSA
59	VL BMA031	VL гуманизованное BMA031 Shearman <i>et al.</i>	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSATSSVSYMH WYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGS GTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGA GTKLELK

60	HC BMA031 (V36)		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDVTKYAEK FQGRVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDVAVHYC ARGSYDYEGFVYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	huIgG1 Fc	huIgG1 (G1m17,1), включая шарнир	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	HCDR1 Chothia		GYKFTSY
63	HCDR2 Chothia		NPYNDV
64	HCDR3		GSYYDYEGFVY
65	LCDR3		QQWSSX ₂ X ₃ LT, где X ₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Q, D, H, S, Y, A и N, и X ₃ представляет собой P или A
66	LCDR3		QQWSX ₁ NX ₃ LT, где X ₁ представляет собой S или N, и X ₃ представляет собой P или A
67	LCDR3		QQWSX ₁ X ₂ PLT, где X ₁ представляет собой S или N, и X ₂ представляет собой аминокислоту,

			выбранную из группы, состоящей из Q, D, H, S, Y, A и N.
68	LCDR3		QQWSSQPLT
69	LCDR3		QQWSSDPLT
70	LCDR3		QQWSSHPLT
71	LCDR3		QQWSSSPLT
72	LCDR3		QQWSSYPLT
73	LCDR3		QQWSSAPLT
74	LCDR3		QQWSSNPLT
75	LCDR3		QQWSSQALT
76	LCDR3		QQWSSDALT
77	LCDR3		QQWSSHALT
78	LCDR3		QQWSSSALT
79	LCDR3		QQWSSYALT
80	LCDR3		QQWSSAALT
81	LCDR3		QQWSSNALT
82	LCDR3		QQWSNQPLT
83	LCDR3		QQWNSDPLT
84	LCDR3		QQWNSHPLT
85	LCDR3		QQWNSSPLT
86	LCDR3		QQWNSYPLT
87	LCDR3		QQWNSAPLT
88	LCDR3		QQWNSNPLT
89	LCDR3		QQWSNQALT
90	LCDR3		QQWNSDALT
91	LCDR3		QQWNSHALT
92	LCDR3		QQWNSSALT
93	LCDR3		QQWNSYALT
94	LCDR3		QQWNSAALT
95	LCDR3		QQWNSNALT
96	LCDR3		QQWSX ₁ NPLT, где X ₁ представляет собой S или N
97	GL1_BM_ VH28_HV		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSY VMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKF

			KGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCA RGSYYDYDGFVYWGQGLVTVSS
98	GL1_BM_ VH31_HV		<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV</u> SCKAS <u>SGYKFTSY</u> <u>VMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKF</u> <u>KGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCA</u> <u>RGSYYDYDGFVYWGQGLVTVSS</u>
99	HEBE1_H1 0_HV		EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYV MHWVKQAPGKGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFK GKATLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVHYCA RGSYYDYDGFVYWGQGLVTVSS
100	HEBE1_H6 6_HV		EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYV <u>MHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKF</u> <u>KGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> <u>ARGSYDYDGFVYWGQGLVTVSS</u>
101	HEBE1_H7 1_HV		EVQLLESGGGLVQPGGSVRLSCAASGYKFTSYV <u>MHWVRQAPGKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKF</u> <u>KGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC</u> <u>ARGSYDYDGFVYWGQGLVTVSS</u>
102	GL1BMVK 43_VL		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHW YQQKPGQAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGT SYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTK VEIK
103	HFR1		EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFT
104	HFR2		WVRQAPGQGLEWMG
105	HFR3		RVTLTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVHYCAR
106	HFR4		WGQGLVTVSS
107	LFR1		QIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
108	LFR2		WYQQKPGKAPKRWIY
109	LFR3		GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDAATYYC
110	LFR4		FGGGTKVEIK
111	IgG Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVC

			<p>TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSP</p>
112	IgG Fc		<p>EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSP</p>

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий полипептид, содержащий переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52,

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой A или N,

X₂ представляет собой E или Q, и/или

X₃ представляет собой Q или K

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR)1-4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54,

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55,

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LFR)1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) положение 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату содержит замену на остаток тирозин (Y),

и где антигенсвязывающий полипептид специфически связывается с комплексом T-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3.

2. Антигенсвязывающий полипептид по п. 1, где положительно заряженные аминокислоты присутствуют:

- (i) в одном или более из следующих положений тяжелой цепи: 31, 53 и 54, и/или
- (ii) в одном или более из следующих положений легкой цепи: 31 и 56,

и где положения указаны согласно нумерации по Кабату.

3. Антигенсвязывающий полипептид по п. 1 или 2, где

(a) положительно заряженная аминокислота в тяжелой цепи:

- (i) в положении 30 представляет собой R, K или H,
- (ii) в положении 31 представляет собой R, K или H,
- (iii) в положении 53 представляет собой R, K или H, и/или
- (iv) в положении 54 представляет собой R или K, и/или

(b) положительно заряженная аминокислота в легкой цепи

- (i) в положении 31 представляет собой R или K, и/или
- (ii) в положении 56 представляет собой R или K.

4. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1 - 3, где VH и VL образуют первый сайт связывания, и где антигенсвязывающий полипептид содержит второй антигенсвязывающий сайт.

5. Антигенсвязывающий полипептид по п. 4, где второй антигенсвязывающий сайт содержит по меньшей мере переменную область:

- (i) цепи α (V_α) и/или β (V_β) в TCR, или
- (ii) цепи γ (V_γ) и/или δ (V_δ) в TCR, или
- (iii) легкой цепи, отличной от VL, как определено в п. 1, и/или тяжелой цепи, отличной от VH, как определено в п. 1.

6. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-5, где положительно заряженная аминокислота выбрана из группы, состоящей из аргинина (R), гистидина (H) и лизина (K), где предпочтительно положительно заряженная аминокислота представляет собой R или K.

7. Антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1-6, где

(i) треонин (T) в положении 30 в тяжелой цепи заменен на аспарагин (N) или серин (S),

- (ii) S в положении 31 в тяжелой цепи заменен на N,

(iii) валин (V) в положении 56 в тяжелой цепи заменен на изолейцин (I),
(iv) глутаминовая кислота (E) в положении 100a в тяжелой цепи заменена на аспарагиновую кислоту (D), и/или

(v) S в положении 31 и/или положении 93 в легкой цепи заменен/заменены на N.

8. Нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот, кодирующие антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1 – 7, или вектор нуклеиновой кислоты, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

9. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1 - 7, или нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор по п. 8, где указанная клетка-хозяин представляет собой

(i) лимфоцит, предпочтительно Т-лимфоцит или клетку-предшественник Т-лимфоцита, например, CD4 или CD8-положительную Т-клетку, или

(ii) клетку для рекомбинантной экспрессии, такую как клетка яичника китайского хомячка (СНО) или дрожжевая клетка.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий полипептид по любому из пп. 1 - 7, нуклеиновую кислоту, или набор нуклеиновых кислот, или вектор по п. 8, или клетку-хозяин по п. 9, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, стабилизатор и/или вспомогательное вещество.

11. Способ получения антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 1 - 7, предусматривающий

(i) предоставление подходящей клетки-хозяина,

(ii) предоставление генетической конструкции, содержащей кодирующую последовательность, кодирующую антиген,

(iii) связывание полипептида по любому из пп. 1 - 7,

(iv) введение указанной генетической конструкции в указанную подходящую клетку-хозяин, и

(iv) экспрессию указанной генетической конструкции указанной подходящей клеткой-хозяином.

12. Применение антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 1 - 7, нуклеиновой кислоты, или набора нуклеиновых кислот, или вектора по п. 8, клетки-хозяина по п. 9 или фармацевтической композиции по п. 10 в медицине.

13. Применение антигенсвязывающего полипептида по любому из пп. 1 - 7, нуклеиновой кислоты или вектора по п. 8, клетки-хозяина по п. 9 или фармацевтической композиции по п. 10 для диагностики, профилактики и/или лечения пролиферативного заболевания, предпочтительно рака.

14. Способ улучшения или поддержания связывания и/или улучшения стабильности антигенсвязывающего полипептида, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где

(1) VH содержит

(a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52 (SYVMH),

(b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно YINPYNDVTKYX₁X₂KFX₃G (SEQ ID NO: 53), где

X₁ представляет собой A или N,

X₂ представляет собой E или Q, и/или

X₃ представляет собой Q или K

(c) HCDR3 и

(d) каркасные области тяжелой цепи (HFR)1-4,

(2) VL содержит

(a) определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54 (SATSSVSYMH),

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55 (DTSKLAS),

(c) LCDR3 и

(d) каркасные области легкой цепи (LCR)1-4,

где

(i) по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 52, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности HCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 53, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(ii) по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR1, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 54, и/или по меньшей мере одна аминокислота последовательности LCDR2, содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, которая не является положительно заряженной, заменена на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iii) положение 30 в HFR1 согласно нумерации по Кабату содержит замену на положительно заряженную аминокислоту, и/или

(iv) положение 90 в HFR3 согласно нумерации по Кабату содержит замену на остаток тирозин (Y),

где

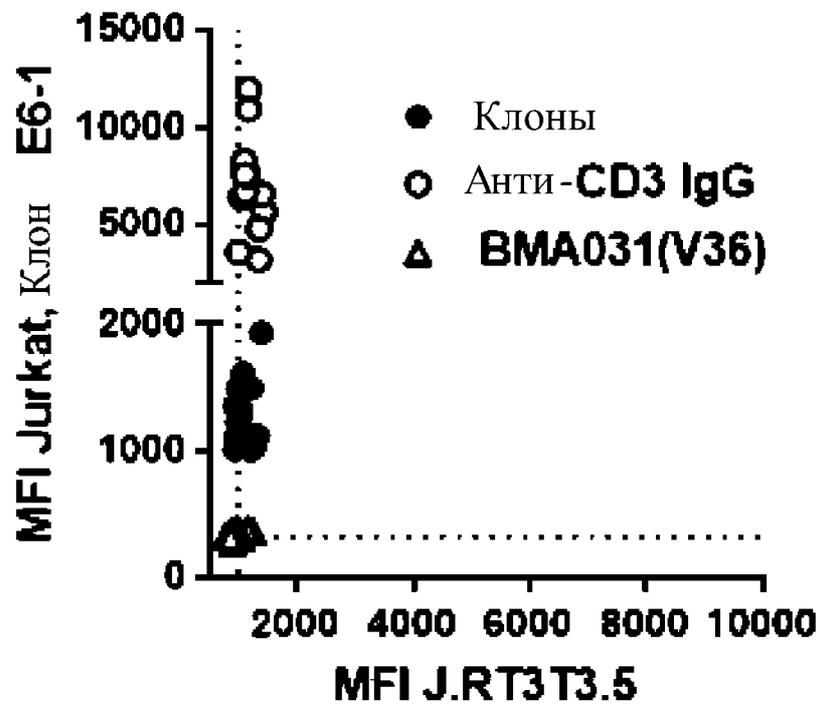
(1) связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3 увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом,

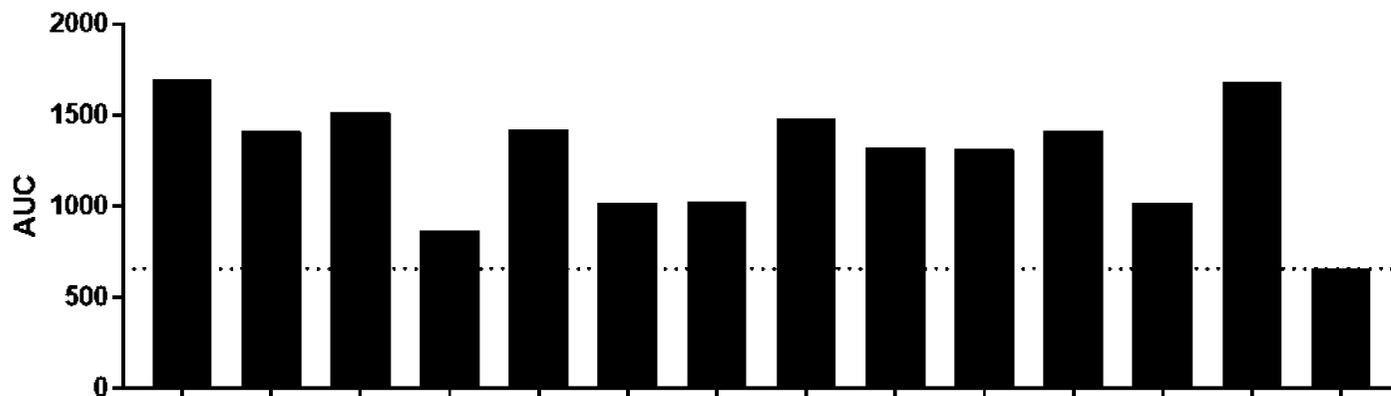
(2) связывание антигенсвязывающего полипептида с комплексом Т-клеточный рецептор α/β (TCR)/CD3 поддерживается или увеличивается и стабильность антигенсвязывающего полипептида увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом, или

(3) стабильность антигенсвязывающего полипептида увеличивается по сравнению с родительским антигенсвязывающим полипептидом.

15. Способ обнаружения, определения и обогащения Т-клеток, экспрессирующих комплекс TCR α/β /CD3, предусматривающий стадию контакта клеток с антигенсвязывающим полипептидом по любому из пп. 1-7.

Фиг. 1

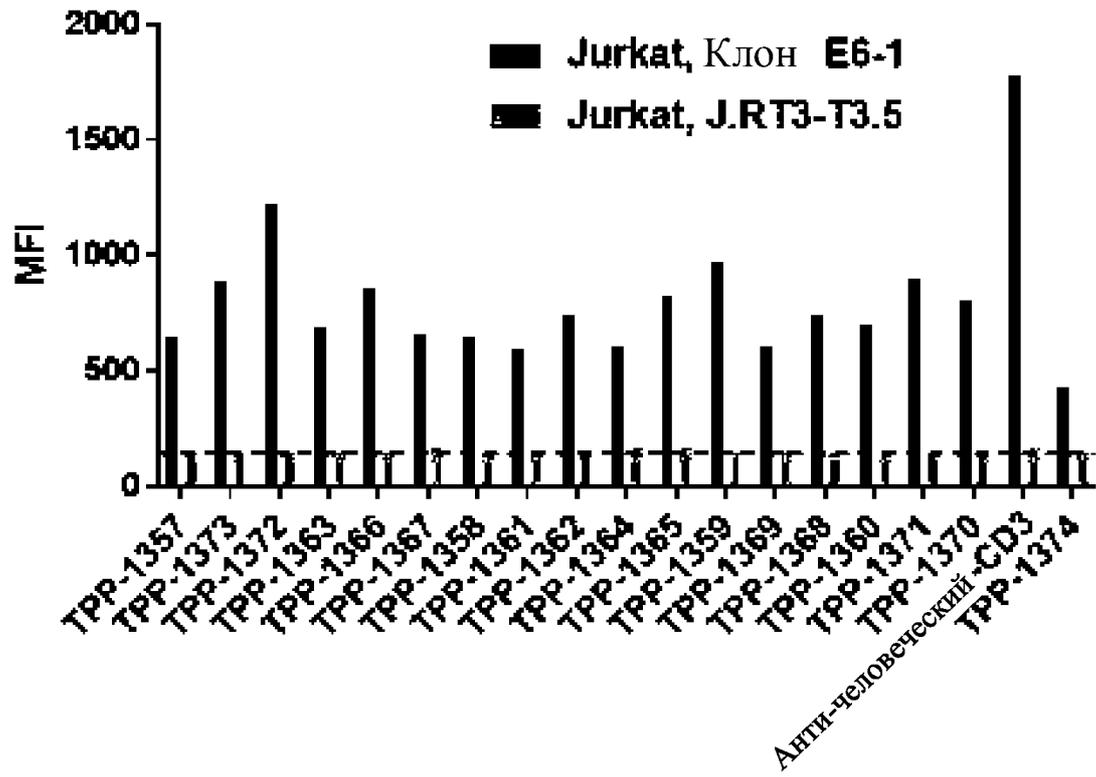




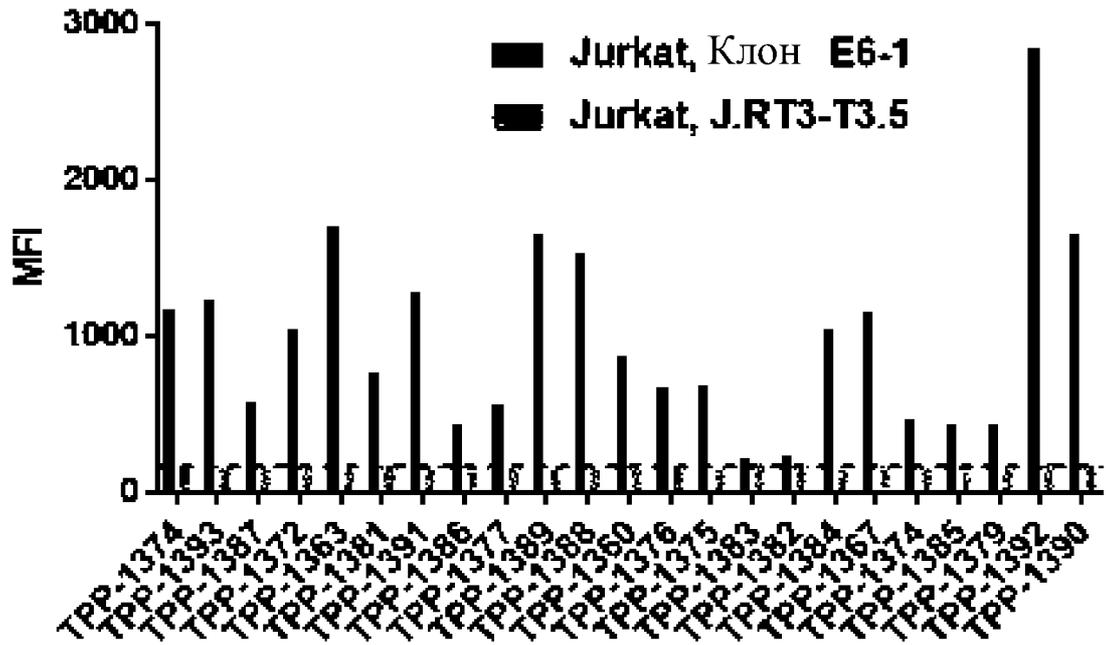
HCDR1	T30	S	S	S	S	N	N	N	-	-	-	-	R	-	-
HCDR1	S31	R	-	-	-	R	R	N	R	R	R	R	-	-	-
HCDR2	Y53	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-	-	-	K	-
HCDR2	N54	-	-	-	-	-	-	-	K	-	-	-	-	-	-
HCDR2	V56	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCDR3	E100A	D	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	R	R	-
LCDR1	S31	-	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-
LCDR2	S56	-	R	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-	-	-
LCDR3	S93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	-
HFR3	H90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Y	Y	-
TPP-		1359	1371	1370	1361	1365	1358	1364	1366	1369	1362	1368	1357	1373	1374

Фиг. 2

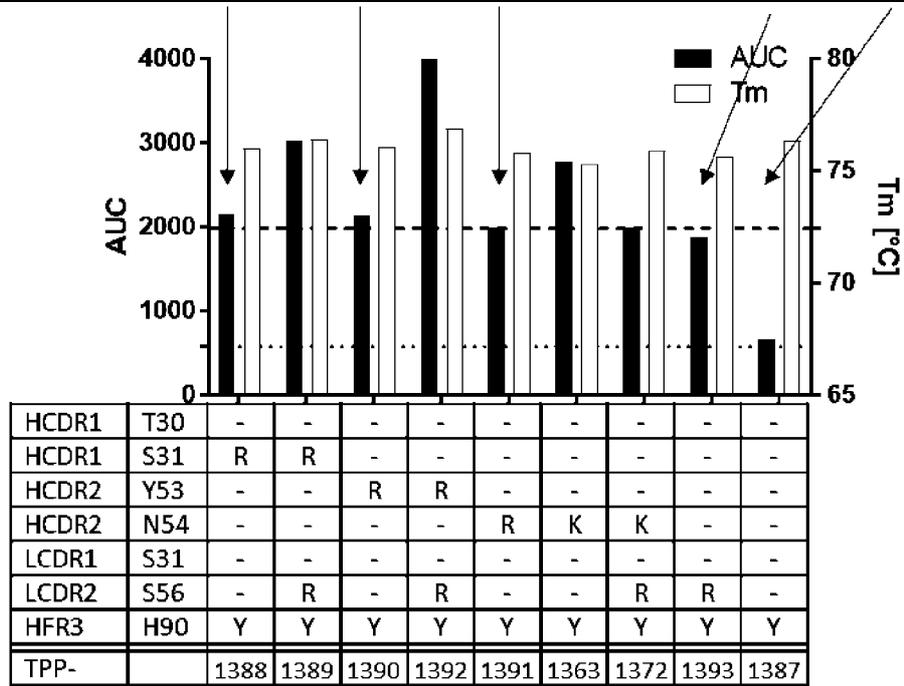
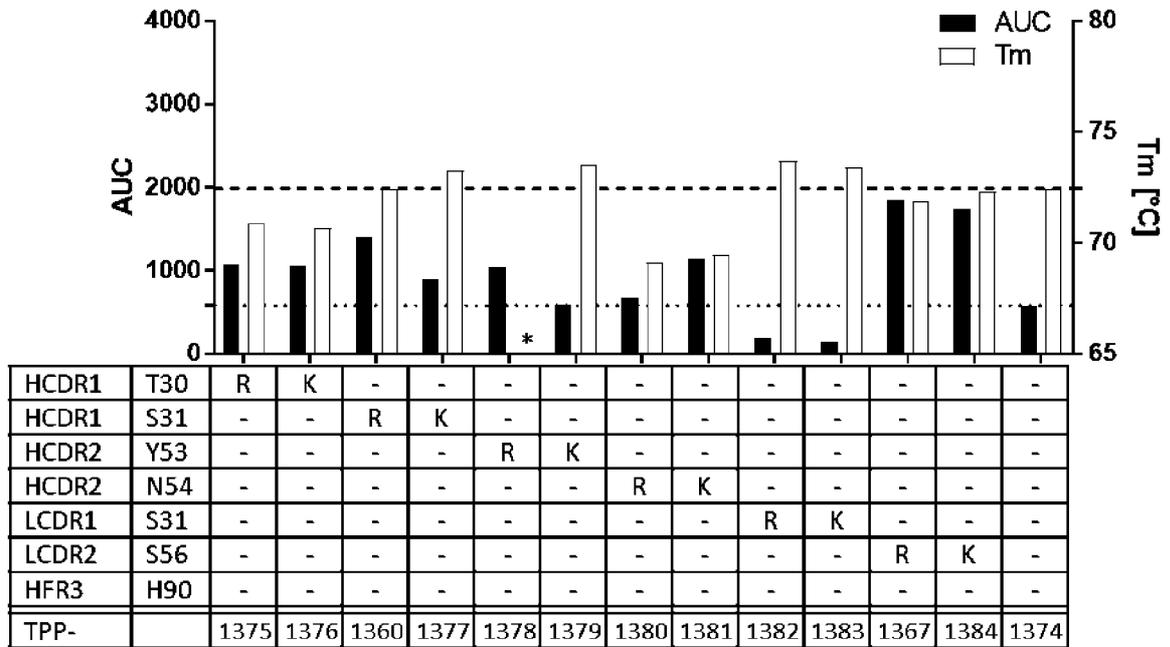
Фиг. 3

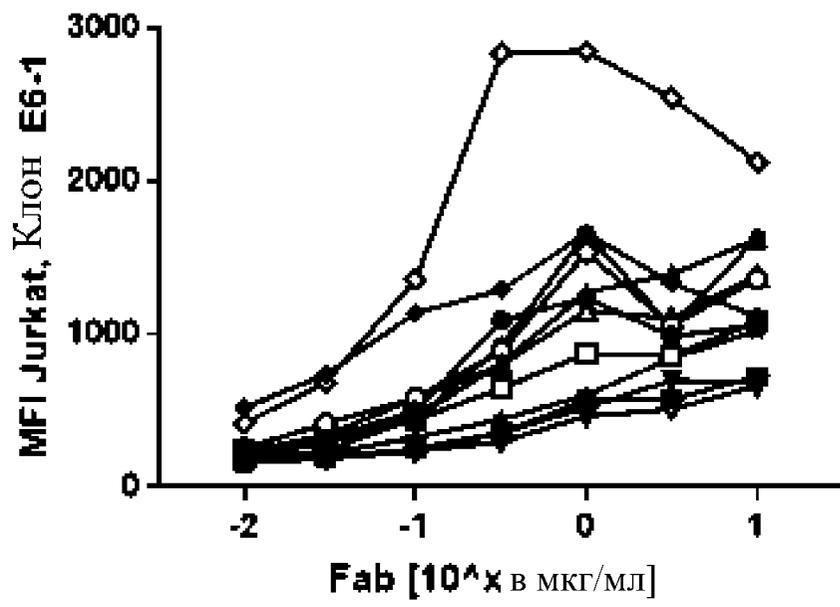


Фиг. 4



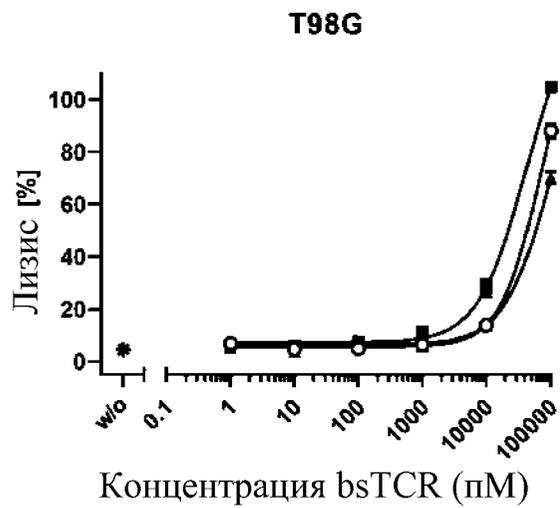
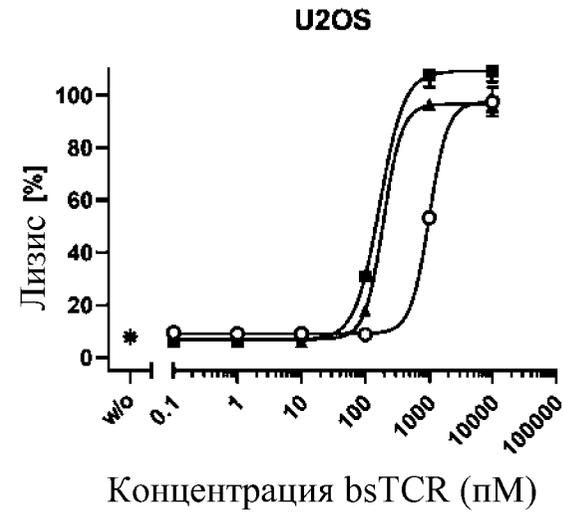
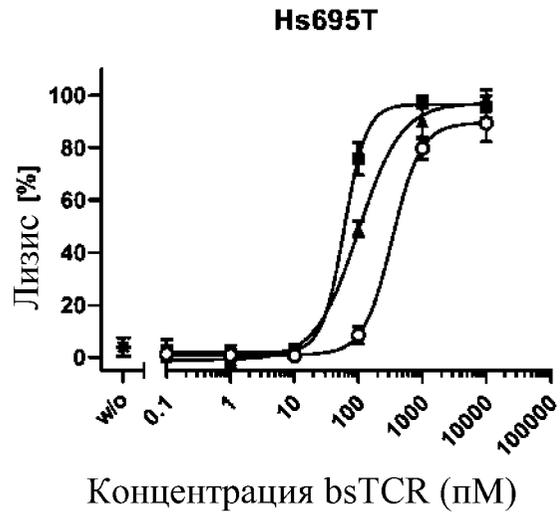
Фиг. 5





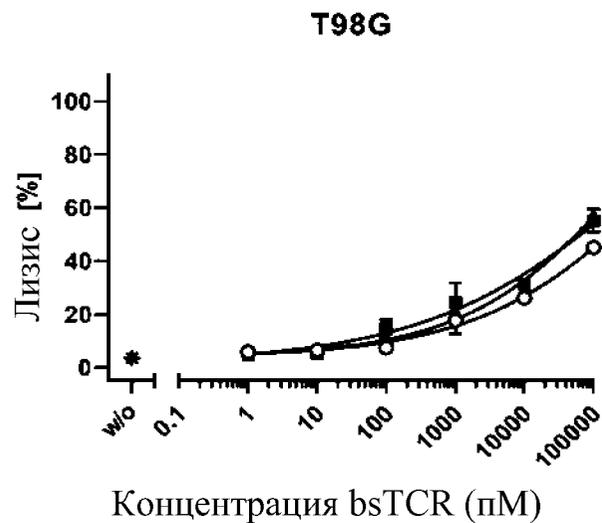
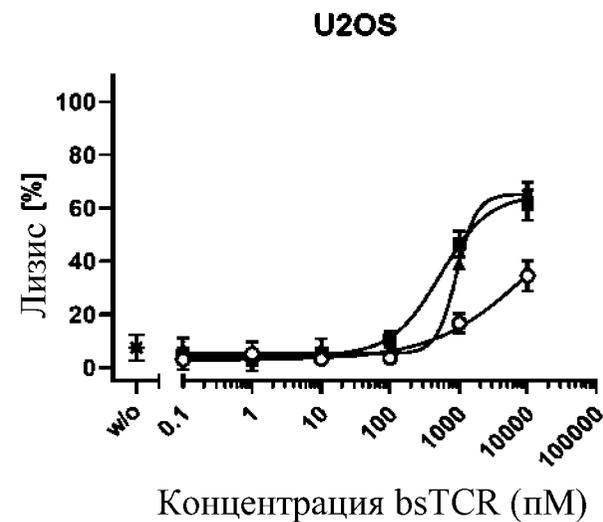
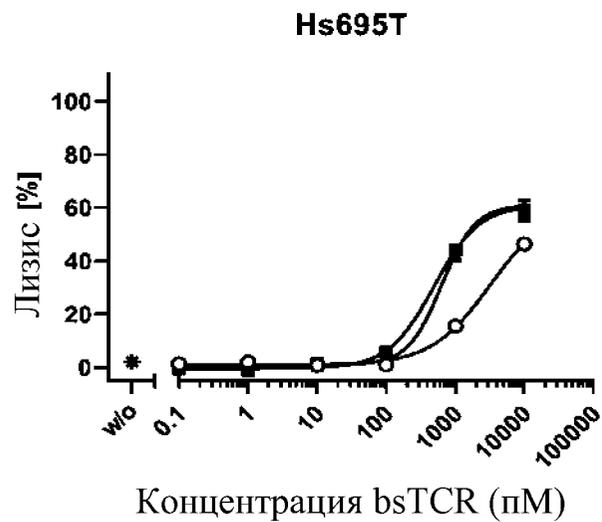
- ◇ VH_Y53R_H90Y_VL_S56R
- VH_Y53R_H90Y_VL_wt
- ◆ VH_S31R_H90Y_VL_S56R
- ▲ VH_N54R_H90Y_VL_wt
- VH_S31R_H90Y_VL_wt
- VH_H90Y_VL_S56R
- VH_S31R_VL_wt
- * VH_Y53R_VL_wt
- ▲ VH_wt_VL_S56R
- ▼ VH_N54R_VL_wt
- VH_H90Y_VL_wt
- ▼ VH_wt_VL_wt

Фиг. 6



- TPP-226
- TPP-879
- ▲ TPP-894
- * без TCER

Фиг. 7



- TPP-226
- TPP-879
- ▲ TPP-894
- * без TCER

Фиг. 8