

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046081**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/705 (2006.01)**
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092907

(22) Дата подачи заявки
2019.05.28

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ИХ
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ**

(31) **62/677,137**

(32) **2018.05.28**

(33) **US**

(43) **2021.04.13**

(86) **PCT/US2019/034186**

(87) **WO 2019/231920 2019.12.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДРАГОНФЛАЙ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Чан Грегори П., Чеунг Энн Ф., Ду
Цзыньянь, Фэллон Дэниел, Гринберг
Ася, Хани Уилльям, О'Нил Стивен,
Вэй Ронни, Лунде Брэдли М., Принц
Бьянка (US)**

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

(56) **WO-A2-2016207273**
US-A1-20090304696
US-A1-20050244416
US-A1-20170369595
WO-A2-2016100533
WO-A1-2016184592
WO-A2-2006037960

(57) В изобретении предложены усовершенствования антител с одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv), мультиспецифических связывающих белков, фармацевтических композиций, содержащих такие белки, и терапевтических способов с использованием таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака.

B1

046081

046081

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/677137, поданной 28 мая 2018 г., раскрытие которой включено в данное описание в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

Перечень последовательностей

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 28 мая 2019 г., называется DFY-049WO_SL_ST25.txt и имеет размер 340 101 байт.

Область техники

В изобретении предложено усовершенствования антител с одноцепочечным варибельным фрагментом (scFv) и мультиспецифического связывающего белка, фармацевтических композиций, содержащих такие белки, и терапевтических способов с использованием таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака.

Уровень техники

Рак продолжает оставаться серьезной проблемой для здоровья, несмотря на значительные научно-исследовательские разработки и достижения, о которых сообщается в литературе по лечению данного заболевания. Некоторые из наиболее часто диагностируемых видов рака включают рак простаты, рак молочной железы и рак легких. Рак простаты является наиболее распространенной формой рака у мужчин. Рак молочной железы остается основной причиной смерти женщин. Современные методы лечения этих видов рака не эффективны для всех пациентов и/или могут иметь серьезные нежелательные побочные эффекты. Другие типы рака также по-прежнему сложно лечить с помощью существующих терапевтических методов.

Иммунотерапия рака желательна, поскольку она высокоспецифична и может способствовать разрушению раковых клеток с использованием собственной иммунной системы пациента. Слитые белки, такие как биспецифические активаторы Т-клеток, представляют собой описанные в литературе виды иммунотерапии рака, которые связываются с опухолевыми клетками и Т-клетками для облегчения разрушения опухолевых клеток. В литературе описаны антитела, которые связываются с определенными ассоциированными с опухолью антигенами, и с определенными иммунными клетками. См., Например, WO 2016/134371 и WO 2015/095412.

Натуральные киллеры (НК) являются компонентом врожденной иммунной системы и составляют примерно 15% циркулирующих лимфоцитов. НК-клетки проникают практически во все ткани и изначально характеризовались своей способностью эффективно убивать опухолевые клетки без необходимости предварительной сенсibilизации. Активированные НК-клетки убивают клетки-мишени способами, аналогичными цитотоксическим Т-клеткам, - т.е., с помощью цитолитических гранул, содержащих перфорин и гранзимы, а также с помощью метаболического пути рецепторов смерти. Активированные НК-клетки также секретируют воспалительные цитокины, такие как IFN- γ и хемокины, которые способствуют привлечению других лейкоцитов в ткань-мишень.

НК-клетки отвечают на сигналы через множество активирующих и ингибирующих рецепторов на своей поверхности. Например, когда НК-клетки сталкиваются со здоровыми аутологичными клетками, их активность ингибируется за счет активации иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток (KIR). Альтернативно, когда НК-клетки встречают чужеродные или раковые клетки, они активируются через свои активирующие рецепторы (например, NKG2D, NCR, DNAM1). НК-клетки также активируются константной областью некоторых иммуноглобулинов через рецепторы CD16 на их поверхности. Общая чувствительность НК-клеток к активации зависит от суммы стимулирующих и ингибирующих сигналов. NKG2D представляет собой трансмембранный белок типа II, который экспрессируется практически всеми натуральными клетками-киллерами, где NKG2D служит активирующим рецептором. NKG2D также находится на Т-клетках, где он действует как костимулирующий рецептор. Способность модулировать функцию НК-клеток через NKG2D полезна в различных терапевтических контекстах, включая злокачественные новообразования.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает усовершенствование одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), который связан с константным доменом антитела через шарнирную последовательность. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. ScFv может включать варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления ScFv связывает NKG2D или ассоциированный с опухолью антиген. Шарнирная последовательность обеспечивает гибкость связывания с антигеном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления scFv варибельный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с варибельным доменом легкой цепи. Например, дисульфидный мостик может быть образован между остатком C44 варибельного домена тяжелой цепи и остатком C100 варибельного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления варибельный домен тяжелой цепи связан с

вариабельным доменом легкой цепи через гибкий линкер, такой как $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 427). В некоторых вариантах осуществления scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на N-конце вариабельного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv вариабельный домен тяжелой цепи расположен на C-конце вариабельного домена легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела, связанный с scFv, способен связываться с CD16. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела включает домен CH2 и домен CH3 антитела IgG, например, антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления мутации вводятся в константный домен антитела, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к белку, который содержит scFv, связанный с константной областью антитела, описанной выше. В некоторых вариантах осуществления белок включает первый антигенсвязывающий сайт, который включает scFv, связанный с константным доменом антитела; второй антигенсвязывающий сайт, который может принимать формат Fab или scFv, описанный в данном документе; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом. В некоторых вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, вторые антигенсвязывающие сайты связывают ассоциированный с опухолью антиген, а константные области антитела связывают CD16.

В некоторых других вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, а константные области антитела связывают CD16. Константная область антитела, связанная с scFv, может гетеродимеризоваться со второй константной областью антитела. Мультиспецифические связывающие белки в этих вариантах осуществления связываются с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на натуральных клетках-киллерах, и с ассоциированным с опухолью антигеном на раковых клетках. Такие белки могут задействовать более одного типа NK-активирующих рецепторов и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у человека. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у людей и/или у других видов, таких как грызуны и/или яванские макаки.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает мультиспецифический связывающий белок, и этот белок содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает тот же ассоциированный с опухолью антиген, что и первый антигенсвязывающий сайт; третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv, таких как описанные выше. Предложенный в данном документе мультиспецифический связывающий белок обеспечивает бивалентное взаимодействие с ассоциированным с опухолью антигеном, тем самым стабилизируя ассоциированный с опухолью антиген на поверхности раковых клеток и усиливая цитотоксичность NK-клеток по отношению к раковым клеткам.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бивалентное вовлечение ассоциированных с опухолью антигенов мультиспецифическими связывающими белками обеспечивает более сильное связывание мультиспецифических связывающих белков с раковыми клетками, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу NK-клеток в отношении раковых клеток, особенно в отношении раковых клеток, экспрессирующих низкий уровень ассоциированного с опухолью антигена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мультиспецифические связывающие белки включают в себя часть Fc-домена антитела, достаточную для связывания CD16, где Fc-домен антитела содержит шарнир и домен CH2 и/или аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% идентичные аминокислотной последовательности 234-332 антитела IgG человека. В константный домен антитела можно ввести мутации, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по

меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

Описанный выше сайт связывания ассоциированного с опухолью антигена может быть сайтом, который связывается с любым ассоциированным с опухолью антигеном, например, ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, мезотелином, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-альфа, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, нектин4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 и ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-кадгерин, плексином-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (или MUC1-C), плексином-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает белок, содержащий: (a) антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; (b) фрагмент антигенсвязывающего T-клеточного рецептора (TCR); и (c) константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. В некоторых вариантах осуществления белок представляет собой мультиспецифический связывающий белок, содержащий антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает ассоциированный с опухолью антиген (ТАА).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой одноцепочечный фрагмент TCR (scTCR). В некоторых вариантах осуществления фрагмент scTCR связан с полипептидной цепью константной области антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR. В некоторых вариантах осуществления scFv связан с полипептидной цепью константной области антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser. В некоторых вариантах осуществления шарнир дополнительно содержит аминокислотную последовательность Thr-Lys-Gly.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок дополнительно содержит дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает тот же антиген, что и антигенсвязывающий фрагмент TCR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR и дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой внеклеточные фрагменты TCR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR и дополнительный антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой фрагменты scTCR.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифического связывающего белка, который содержит scFv, scFv включает переменный домен тяжелой цепи, связанный с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит (G₄S)₄. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит переменный домен тяжелой цепи, расположенный на N-конце или C-конце переменного домена легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, и причем переменный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления дисульфидный мостик образован между Cys в положении 44 в переменном домене тяжелой цепи и Cys в положении 100 в переменном домене легкой цепи, причем положения определены по нумерации Кабат. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт, содержащий такой дисульфидный мостик, представляет собой scFv.

последовательность бета-цепи, приведенную в SEQ ID NO: 420.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид SSX2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен альфа-цепи, включающий последовательность CDR3 α , приведенную в SEQ ID NO: 387. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR содержит переменный домен бета-цепи, включающий последовательность CDR3 β , приведенную в SEQ ID NO: 388.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок содержит константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, где константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит шарнирную область и домен CH2 антитела IgG1 человека. В определенных вариантах осуществления константная область антитела или ее часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека. В константный домен антитела можно ввести мутации, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека, и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных полипептидов или белков, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D (также называемый "сайтом связывания NKG2D"), сайт связывания NKG2D может включать переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 1, такой что имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 1, и/или включает в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 307), CDR2 (SEQ ID NO: 4) и CDR3 (SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 308) из SEQ ID NO: 1. Переменный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO: 1, может быть соединен с множеством переменных доменов легкой цепи для образования NKG2D-связывающего сайта. Например, сайт связывания NKG2D, который включает переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 1, может дополнительно включать переменный домен легкой цепи, выбранный из любой из последовательностей, относящихся к SEQ ID NO: 2, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 и 43. Например, сайт связывания NKG2D включает в себя переменный домен тяжелой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичными SEQ ID NO: 1, и переменный домен легкой цепи с аминокислотными последовательностями, по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичными любой последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 и 43.

Альтернативно сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 44, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 48. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 44 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 309), CDR2 (SEQ ID NO: 46) и CDR3 (SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 310) из SEQ ID NO: 44. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи второго антигенсвязывающего сайта может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 48 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 50) и CDR3 (SEQ ID NO: 51) из SEQ ID NO: 48.

В других вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 52, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 56. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 52 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные после-

быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 334 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 319), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 336) из SEQ ID NO: 334. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) из SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 337, и переменный домен легкой цепи, относящийся к SEQ ID NO: 98. Например, переменный домен тяжелой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 337 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 319), CDR2 (SEQ ID NO: 96) и CDR3 (SEQ ID NO: 338 или SEQ ID NO: 339) из SEQ ID NO: 337. Аналогичным образом, переменный домен легкой цепи сайта связывания NKG2D может быть по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичным SEQ ID NO: 98 и/или включать в себя аминокислотные последовательности, идентичные последовательностям CDR1 (SEQ ID NO: 99), CDR2 (SEQ ID NO: 100) и CDR3 (SEQ ID NO: 101) из SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO: 110, и переменный домен легкой цепи, связанный с SEQ ID NO: 111, такие что имеют аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO: 110 и по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO: 111, соответственно. В некоторых вариантах осуществления сайт связывания NKG2D может включать в себя переменный домен тяжелой цепи, связанный с SEQ ID NO: 112, и переменный домен легкой цепи, связанный с SEQ ID NO: 113, такие что имеют аминокислотные последовательности по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO: 112 и по меньшей мере на 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичные SEQ ID NO: 113 соответственно.

Также предложены составы, содержащие любой из белков, описанных в настоящем документе; клетки, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, экспрессирующих белки, и способы усиления гибели опухолевых клеток с использованием белков.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения рака у пациента. Способ включает в себя введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества мультиспецифических связывающих белков, описанных в настоящем документе. Рак, подлежащий лечению, может включать острый миелоидный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, В-клеточную лимфому, рак мочевого пузыря, рак молочной груди, колоректальный рак, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, рак пищевода, саркомы Юинга, фолликулярную лимфому, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, опухоли стромы желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, рак головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественные миеломы, миелодиспластический синдром, почечно-клеточную карциному, нейробластомы, мелкоклеточный рак легких, нейроэндокринные опухоли, рак яичников и рак поджелудочной железы, рак простаты, саркомы, мелкоклеточный рак легких, Т-клеточную лимфому, рак яичка, карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, злокачественные заболевания, инфильтрованные миелоидными клетками-супрессорами, злокачественные заболевания, инфильтрованные Т-регуляторными клетками, злокачественные заболевания с накоплением внеклеточного матрикса, злокачественные заболевания с высокими уровнями реактивной стромы и злокачественные заболевания с неоангиогенезом.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1C проиллюстрированы три типичных формата мультиспецифического связывающего белка, который включает scFv, связанный с константной областью/доменом антитела через шарнир. Фиг. 1A показывает триспецифическое антитело (TriNKET), которое содержит нацеленный на опухоль scFv или одноцепочечный фрагмент TCR (scTCR), нацеленный на NKG2D Fab, и константную область/домен гетеродимеризованного антитела ("домен CD"), который связывает CD16. Формат антитела называется в данном документе F3'-TriNKET. Фиг. 1B представляет собой антитело, которое содержит scFv, нацеленный на NKG2D, Fab, нацеленный на опухоль, или внеклеточный фрагмент TCR, и константную область гетеродимеризованного антитела. Формат антитела называется в данном документе F3-TriNKET. Фиг. 1C представляет собой антитело, которое содержит scFv, нацеленный на NKG2D, scFv, нацеленный на опухоль, или фрагмент scTCR, и константную область гетеродимеризованного антитела. В некоторых иллюстративных TriNKET мутации гетеродимеризации в домене CD, связанном с антигенсвязывающим сайтом, который связывает NKG2D, включают K360E и K409W; мутации гетеродимеризации на противоположном CD включают Q347R, D399V и F405T.

На фиг. 2А показано триспецифическое антитело (TriNKET), где первый антигенсвязывающий сайт или антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает ассоциированный с опухолью антиген (такой как показанный в данном документе ВСМА) или его пептид, презентованный главным комплексом гистосовместимости (МНС); второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D; и константная область гетеродимеризованного антитела связывает CD16. В некоторых иллюстративных TriNKET мутации гетеродимеризации в домене CD, связанном с антигенсвязывающим сайтом, который связывает NKG2D, включают K360E и K409W; мутации гетеродимеризации на противоположном CD включают Q347R, D399V и F405T.

На фиг. 2В-2С показано триспецифическое антитело (TriNKET), где первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт или первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR связывают один и тот же ассоциированный с опухолью антиген (такой как показанный в данном документе ВСМА) или тот же пептид из опухоль-ассоциированного антигена, презентованный тем же МНС; третий сайт связывания антигена связывает NKG2D; и константная область гетеродимеризованного антитела связывает CD16. Эти форматы антител упоминаются в данном документе как F4-TriNKET. В некоторых иллюстративных TriNKET мутации гетеродимеризации в домене CD, связанном с антигенсвязывающим сайтом, который связывает NKG2D, включают K360E и K409W; мутации гетеродимеризации на противоположном CD включают Q347R, D399V и F405T. На фиг. 2В показано, что первые два антигенсвязывающих сайта представлены в формате Fab. На фиг. 2С показано, что первые два антигенсвязывающих сайта представлены в формате scFv.

На фиг. 3А-3С показаны результаты ускоренного исследования стабильности, проведенного при 37°C, в котором было установлено, что F3'-TriNKET стабилен в течение 4 недель.

На фиг. 4 показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен при низком уровне pH.

На фиг. 5А и фиг. 5В показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен после 5 циклов замораживания-оттаивания, независимо от pH (на фиг. 5А показаны циклы замораживания-оттаивания в PBS, а на фиг. 5В показаны циклы замораживания-оттаивания в цитрате при pH 5,5).

На фиг. 6 показаны столбцовые графики условий принудительной деградации, в которых F3'-TriNKET оставался стабильным.

На фиг. 7 показано связывание F3'-TriNKET-HER2 или трастузумаба с клетками HER2+ Colo-201.

На фиг. 8 показано связывание моноклонального антитела F3'-TriNKET-CD33 или CD33 с CD33, экспрессируемым на клетках Molm-13.

На фиг. 9 и 10 показано опосредованную F3'-TriNKET-HER2 цитотоксичность в отношении клеточной линии 786-0 с низким уровнем HER2 и клеточной линии SkBr-3 с высоким уровнем HER2, соответственно.

На фиг. 11 и фиг. 12 показано опосредованную F3'-TriNKET-CD33 цитотоксичность по отношению к двум CD33-положительным клеточным линиям человека, EOL-1 и THP-1, соответственно.

На фиг. 13А показано, что связывание F3'-TriNKET-HER2 с FcγRIa аналогично герцептину.

На фиг. 13В показано, что связывание F3'-TriNKET-HER2 с FcγRIIa аналогично герцептину. Фиг. 13С показывает, что связывание F3'-TriNKET-HER2 с FcγRIIIa 158V аналогично герцептину.

На фиг. 14А показано, что связывание F3'-TriNKET-HER2, где связывающим агентом HER2 является scFv, с HER2 человека аналогично герцептину, при котором связывающими агентами HER2 являются Fab. Фиг. 14В показывает, что связывание F3'-TriNKET-CD33, где связывающим агентом CD33 является scFv, с CD33 человека аналогично связыванию моноклонального антитела CD33, при котором связывающими агентами CD33 являются Fab.

На фиг. 15 показано, что двухступенчатая очистка F3-TriNKET-ВСМА обеспечивает чистоту 99%.

На фиг. 16 показано одновременное вовлечение мишеней NKG2D и CD33 с высокой эффективностью посредством F3-TriNKET-CD33.

На фиг. 17 показано одновременное вовлечение мишеней NKG2D и ВСМА с высокой эффективностью посредством F3-TriNKET-ВСМА.

На фиг. 18А показано, что формат F3-TriNKET стабилен как минимум на протяжении 14 дней. Фиг. 18В показывает, что формат F3-TriNKET стабилен после удержания при низком pH. Фиг. 18С показывает, что формат F3-TriNKET стабилен как минимум после 5 циклов замораживания-оттаивания.

На фиг. 19 представлены линейные графики, показывающие, что ВСМА, нацеленный на F4-TriNKET, с различными доменами связывания NKG2D, усиливает лизис миеломных клеток KMS12-PE НК-клетками человека.

На фиг. 20 представлены линейные графики, показывающие, что ВСМА, нацеленный на F4-TriNKET, с различными доменами связывания NKG2D, усиливает лизис миеломных клеток MM. 1R НК-клетками человека.

На фиг. 21 представлены линейные графики, показывающие связывание F4-TriNKET, DuoBody-TriNKET и моноклонального антитела ВСМА с миеломными клетками MM.1R.

На фиг. 22 представлены данные FACS, которые показывают, что инкубация с F4-TriNKET со временем увеличивает экспрессию поверхностного ВСМА.

На фиг. 23 представлены линейные графики, показывающие, что F4-TriNKET стабилизирует поверхностный ВСМА.

На фиг. 24 представлены столбчатые графики, показывающие, что F4-TriNKET, нацеленный на ВСМА, со связывающим агентом А49 опосредует более сильное уничтожение миеломных клеток KMS12-PE при различных концентрациях в течение 30 ч, чем Duobody-TriNKET

На фиг. 25 представлены столбчатые графики, показывающие, что F4-TriNKET, нацеленный на ВСМА, со связывающим агентом А49 опосредует более сильное уничтожение миеломных клеток MM.1S при различных концентрациях в течение 30 ч, чем Duobody-TriNKET.

Подробное описание сущности изобретения

Изобретение предлагает усовершенствование одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), который связан с константным доменом антитела через шарнирную последовательность. Шарнирная последовательность обеспечивает гибкость связывания scFv с антигеном. В данном изобретении также предложены мультиспецифические связывающие белки, которые включают один или более scFv, причем мультиспецифические связывающие белки связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на натуральных клетках-киллерах, а также ассоциированный с опухолью антиген. В данном изобретении также предложены мультиспецифические связывающие белки, которые содержат два связанных с опухолью антигенсвязывающих сайта, связывающихся с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, и связывают рецептор NKG2D и рецептор CD16 на натуральных клетках-киллерах. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие такие мультиспецифические связывающие белки, и терапевтические способы, в которых используются такие мультиспецифические связывающие белки и фармацевтические композиции для таких целей, как лечение рака. Различные аспекты изобретения приведены в разделах ниже; однако аспекты изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не ограничиваются каким-либо конкретным разделом.

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже приведены определения для ряда терминов и выражений.

В контексте настоящего документа формы единственного числа означают "один или более" и включают в себя форму множественного числа, если только контекст не предполагает иное.

В контексте настоящего документа термины "субъект" и "пациент" относятся к организму, подлежащему лечению способами и композициями, описанными в настоящем документе. Такие организмы предпочтительно включают в себя без ограничения млекопитающих (например, мышей, обезьян, лошадей, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек и тому подобное) и более предпочтительно включают в себя людей.

В контексте настоящего документа термин "антигенсвязывающий сайт" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. В антителах человека антигенсвязывающий сайт образован из аминокислотных остатков N-концевых варибельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три сильно различающихся участка внутри V-областей тяжелой и легкой цепей называются "гиперварибельными областями", которые расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области", или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые встречаются в природе между и вблизи гиперварибельных областей в иммуноглобулинах. В молекуле антитела человека три гиперварибельные области легкой цепи и три гиперварибельные области тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, а три гиперварибельные области каждой из тяжелой и легкой цепи называются "определяющими комплементарность областями", или "CDR". У определенных животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий сайт образован одной цепью антитела, обеспечивая "однодоменное антитело". Антигенсвязывающие участки могут существовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, которое сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, с использованием пептидного линкера для соединения варибельного домена тяжелой цепи с варибельным доменом легкой цепи в одном полипептиде.

В контексте настоящего описания термины "фрагмент антигенсвязывающего T-клеточного рецептора" и "антигенсвязывающий фрагмент TCR" используются взаимозаменяемо и относятся к части T-клеточного рецептора (TCR), которая связывает родственный антиген. В $\alpha\beta$ TCR человека антигенсвязывающий фрагмент TCR включает варибельный домен альфа-цепи ($V\alpha$) и варибельный домен бета-цепи ($V\beta$), каждый из которых содержит три области, определяющие комплементарность (CDR). Гиперварибельные петли, названные CDR3 α и CDR3 β , занимают центральное положение для связывания пептида антигена; петли CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β и CDR2 β , кодируемые зародышевой линией, больше всего контактируют с МНС, который презентует пептид антигена. В $\gamma\delta$ TCR человека антигенсвязывающий фрагмент TCR включает варибельный домен гамма-цепи ($V\gamma$) и варибельный домен дельта-цепи ($V\delta$), каждый из которых содержит три CDR. $\gamma\delta$ TCR человека распознают антигены (например, пептид или липид), презентованные молекулами МНС или молекулами, относящимися к МНС (например, CD1, эн-

дотелиальный рецептор белка С (EPCR), или связанную с полипептидом МНС класса I последовательность А (MICA)). Понятно, что другие белки, такие как F1-АТФаза, также могут презентовать антигены $\gamma\delta$ TCR. Антигенсвязывающие фрагменты TCR могут существовать в интактном TCR, в сконструированном TCR, имеющем цепи TCR, связанные дисульфидной связью, в антигенсвязывающем фрагменте интактного или сконструированного TCR, который сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде с переменными доменами TCR (например, $V\alpha$ и $V\beta$), соединенными пептидным линкером в едином полипептиде. Неограничивающие примеры антигенсвязывающего фрагмента TCR включают фрагмент TCR, содержащий переменные домены (например, $V\alpha$ и $V\beta$) и константные домены (например, $C\alpha$ и $C\beta$), но не имеющих связывающих областей, трансмембранных областей и цитоплазматических областей TCR, называемых в данном документе "внеклеточным фрагментом TCR", и переменные области TCR (например, $V\alpha$ и $V\beta$), соединенные пептидным линкером, называемые в данном документе "одноцепочечным фрагментом TCR (scTCR)".

Термин "эффективное количество", в контексте настоящего изобретения, относится к количеству соединения (например, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения полезных или желаемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одно или более введений, применений или дозировок, и оно не ограничивается конкретным составом или путем введения. Термин "лечение", в контексте настоящего изобретения, включает в себя любой эффект, например, ослабление, уменьшение, модулирование, облегчение или устранение, которое приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и т.п., или ослабление его симптома.

В контексте настоящего документа термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, делаая композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель", в контексте настоящего изобретения, относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом физиологический раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло) и различные типы смачивающих агентов. Композиции также могут содержать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

В тексте описания, где композиции описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие конкретные компоненты, или где процессы и способы описаны как имеющие, включающие в себя или содержащие конкретные стадии, подразумевается, что дополнительно существуют композиции по настоящему изобретению, которые состоят по существу из или состоят из указанных компонентов, и что существуют процессы и способы по настоящему изобретению, которые состоят по существу из или состоят из указанных стадий процессинга.

Как правило, композиции с указанием процента являются весовыми, если не указано иное. Кроме того, если переменная не сопровождается определением, то предыдущее определение переменной является превалирующим.

I. Белки

Настоящее изобретение предлагает усовершенствование одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), который связан с константным доменом антитела через шарнирную последовательность. В некоторых вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser. В некоторых других вариантах осуществления шарнир содержит аминокислоты Ala-Ser и Thr-Lys-Gly. ScFv может включать переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления ScFv связывает NKG2D или ассоциированный с опухолью антиген. Шарнирная последовательность обеспечивает гибкость связывания scFv с антигеном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи образует дисульфидный мостик с переменным доменом легкой цепи для повышения стабильности scFv. Например, дисульфидный мостик может быть образован между остатком C44 переменного домена тяжелой цепи и остатком C100 переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи связан с переменным доменом легкой цепи через гибкий линкер. Может быть использован любой подходящий линкер, например, линкер $(G_4S)_4$. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на N-конец переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на C-конец переменного домена легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела, связанный с scFv, может происходить из константной области антитела любого вида, которое связывается с CD16. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, со-

бака, кот, мышь или лошадь. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает шарнир, домен СН2, домен СН3 и, необязательно, домен СН1. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела, которая включает шарнир, домен СН2, домен СН3 и, необязательно, домен СН1, происходит из антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

В Fc-домене связывание CD16 опосредовано шарнирной областью и доменом СН2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 в первую очередь сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в домене СН2 (см. Sondermann et al., Nature, 406 (6793):267-273). Основываясь на известных доменах, мутации могут быть выбраны для повышения или понижения аффинности связывания с CD16, например, используя библиотеки фагового дисплея или библиотеки выявляемых на поверхности дрожжей кДНК, или могут быть сконструированы, основываясь на известной трехмерной структуре взаимодействия.

В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела включает домен СН2 и домен СН3 антитела IgG, например, антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления мутации вводятся в константный домен антитела, чтобы сделать возможной гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела происходит из константного домена IgG1 человека, константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439. В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека и отличается одной или более заменами, выбранными из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

Ниже перечислены примеры scFv, связанного с константной областью антитела, который также включает мутации, которые делают возможной гетеродимеризацию двух полипептидных цепей. В качестве примера используется scFv, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) и вариабельный домен легкой цепи (V_L), из трастузумаба. Каждая последовательность представляет собой $V_L-(G_4S)_4-V_H$ -шарнир (AS)-Fc, содержащий мутации гетеродимеризации (подчеркнуты). V_L и V_H содержат мостик $44V_H-100V_L$ S-S (подчеркнут) и могут происходить от любого нацеленного на опухоль или связывающего NKG2D антитела. Ala-Ser (AS, подчеркнутый) включен в последовательность локтевидного шарнира, чтобы сбалансировать гибкость и оптимальную геометрию. В некоторых вариантах осуществления к последовательности AS на шарнире может быть добавлена дополнительная последовательность Thr-Lys-Gly. Линкер $(G_4S)_4$ подчеркнут в последовательностях, перечисленных в абзаце ниже.

Трастузумаб -scFv-Fc A1 и трастузумаб -scFv-Fc B1 могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер. Трастузумаб -scFv-Fc A2 и трастузумаб -scFv-Fc B2 могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер.

Трастузумаб -scFv-Fc A1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLY

SGVPSRFGSRSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO:303)

Трастузумаб -scFv-Fc B1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
 SGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO:304)

Трастузумаб -scFv-Fc A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
 SGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO:305)

Трастузумаб -scFv-Fc B2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
 SGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPT
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
 GQGTLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
 ID NO:306)

В другом аспекте настоящее изобретение относится к белку, который содержит scFv, связанный с константной областью антитела, описанной выше. В некоторых вариантах осуществления белок включает первый антигенсвязывающий сайт, который включает scFv, связанный с константным доменом антитела; второй антигенсвязывающий сайт, который может принимать формат Fab или scFv; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом. В некоторых вариантах осуществления белок является мультиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, вторые антигенсвязывающий сайты в форме Fab связывают ассоциированный с опухолью антиген, а константные области антитела связывают CD16 (упоминаемые в данном документе как F3-TriNKET, как показано на фиг. 1B). В некоторых других вариантах осуществления белок является мульт-

тиспецифическим, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, второй антигенсвязывающий сайт в форме Fab связывает NKG2D, а константные области антитела связывают CD16 (упоминаемые в данном документе как F3'-TriNKET, как показано на фиг. 1A). Константная область антитела, связанная с scFv, гетеродимеризуется с константной областью антитела второго антигенсвязывающего сайта описанных в данном документе белков. Мультиспецифические связывающие белки, включая scFv, описанный в данном документе, могут принимать различные форматы, как показано на фиг. 1A-1C.

Мультиспецифические связывающие белки могут связываться с клетками, экспрессирующими рецептор NKG2D, которые могут включать в себя без ограничения NK-клетки, $\gamma\delta$ T-клетки и $CD8^+ \alpha\beta$ T-клетки. При связывании с NKG2D мультиспецифические связывающие белки могут блокировать связывание природных лигандов, таких как ULBP6 и MICA, с NKG2D и активацию рецепторов NKG2D.

Мультиспецифические связывающие белки связываются с клетками, экспрессирующими CD16, рецептором Fc на поверхности лейкоцитов, включая натуральные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки и фолликулярные дендритные клетки.

При связывании с рецептором NKG2D и рецептором CD16 на натуральных клетках-киллерах и ассоциированным с опухолью антигеном на раковых клетках, мультиспецифические связывающие белки могут взаимодействовать более чем с одним типом NK-активирующих рецепторов и могут блокировать связывание природных лигандов с NKG2D. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у человека. В некоторых вариантах осуществления белки могут агонизировать NK-клетки у людей и у других видов, таких как грызуны и яванские макаки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает тот же ассоциированный с опухолью антиген, что и первый антигенсвязывающий сайт; третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из антигенсвязывающих сайтов может каждый принимать форму Fab или scFv. Иллюстративные форматы показаны на фиг. 2B-2C. Как V_H - V_L , так и V_L - V_H ориентации scFv являются вариантами осуществления настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляет собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляют собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляет собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с одним и тем же ассоциированным с опухолью антигеном, представляют собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт F4-TriNKET по настоящему изобретению имеют идентичные аминокислотные последовательности.

В других вариантах осуществления описанный в настоящем документе мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий сайт, который связывает ассоциированный с опухолью антиген; второй антигенсвязывающий сайт, который связывает другой антиген; третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Любой из антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv (в ориентации VH - VL или VL - VH). В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляют собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляют собой scFv, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт или второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляет собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий сайт и второй антигенсвязывающий сайт, которые связываются с двумя разными антигенами, представляют собой Fab, а третий антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D, представляет собой scFv.

В определенных вариантах осуществления предложенный в данном документе мультиспецифический связывающий белок (упоминаются в данном документе как F4-TriNKET) обеспечивает бивалентное

взаимодействие с ассоциированным с опухолью антигеном, тем самым стабилизируя и поддерживая ассоциированный с опухолью антиген на поверхности раковых клеток и усиливая цитотоксичность НК-клеток по отношению к раковым клеткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения бивалентное вовлечение ассоциированных с опухолью антигенов мультиспецифическими связывающими белками обеспечивает более высокую avidность мультиспецифических связывающих белков для раковых клеток, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу НК-клеток в отношении раковых клеток, особенно в отношении раковых клеток, экспрессирующих низкий уровень ассоциированного с опухолью антигена.

В настоящем изобретении также предложен мультиспецифический связывающий белок, содержащий: (a) антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; (b) фрагмент антигенсвязывающего TCR и (c) константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или дополнительный антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR связывает пептид из ассоциированного с опухолью антигена (ТАА), презентованного МНС, например, пептид из ассоциированного с опухолью антигена человека, презентованный лейкоцитарным антигеном человека (HLA). Элемент (b) может существовать в различных форматах (например, растворимых форматах), таких как внеклеточный фрагмент TCR или фрагмент scTCR. Элементы (a) и (c) могут существовать в различных форматах и/или содержать различные мутации, описанные выше. Например, в некоторых вариантах осуществления элемент (c) представляет собой константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, причем константная область антитела или ее часть содержит (i) первый константный домен антитела, связанный с сайтом связывания антигена, который связывается NKG2D, и (ii) второй константный домен антитела, связанный с антигенсвязывающим фрагментом TCR, причем первый и второй константные домены антитела могут гетеродимеризоваться.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab-фрагмент, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой фрагмент scTCR. Учитывая, что его NKG2D-связывающая часть представляет собой Fab, а его ТАА-связывающая часть включает переменные домены, связанные пептидным линкером в единую цепь (аналогично мультиспецифическому связывающему белку, содержащему первый антигенсвязывающий сайт, который содержит scFv, связанный с константным доменом антитела; и второй антигенсвязывающий сайт, который принимает форму Fab; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, второй антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, а константные области антитела связывают CD16), формат этого мультиспецифического связывающего белка также упоминается в данном документе как F3'-TriNKET, как показано на фиг. 1A.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR. Учитывая, что его NKG2D-связывающая часть представляет собой scFv, а его ТАА-связывающая часть включает переменные домены и константные домены (аналогично мультиспецифическому связывающему белку, содержащему первый антигенсвязывающий сайт, который содержит scFv, связанный с константным доменом антитела; и второй антигенсвязывающий сайт, который принимает форму Fab; и второй константный домен антитела, связанный со вторым антигенсвязывающим сайтом, причем первый антигенсвязывающий сайт связывает NKG2D, второй антигенсвязывающий сайт связывает ассоциированный с опухолью антиген, а константные области антитела связывают CD16), формат этого мультиспецифического связывающего белка также упоминается в данном документе как F3-TriNKET, как показано на фиг. 1B.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой scFv, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой фрагмент scTCR. Такой формат показан на фиг. 1C. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой Fab, и антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой внеклеточный фрагмент TCR. Такой формат показан на фиг. 2A.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический связывающий белок содержит первый антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает антиген (например, пептид ТАА, презентованный МНС); второй антигенсвязывающий фрагмент TCR, который связывает тот же антиген, что и первый антигенсвязывающий фрагмент TCR; антигенсвязывающий сайт, который связывает NKG2D; и константную область антитела или ее часть, достаточную для связывания CD16, или четвертый антигенсвязывающий сайт, который связывает CD16. Альтернативно, предполагается, что первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR могут связывать два разных пептида ТАА, презентованных одними и теми же или разными МНС. Любой из антигенсвязывающих сайтов может принимать форму Fab или scFv. Первый и второй антигенсвязывающие фрагменты TCR могут принимать форму либо внеклеточного фрагмента TCR, либо фрагмента scTCR. Типичные форматы, которые обеспечивают бивалентное вовлечение антигена (например, пептид ТАА, презентованный МНС), упоминаются в данном документе как F4-TriNKET и показаны на фиг. 2B-2C.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй анти-

генсвязывающий фрагмент TCR F4-TriNKET по настоящему изобретению связываются с одним и тем же пептидом ТАА, презентованным одним и тем же МНС. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR или второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой scFv. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR или второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий фрагмент TCR и второй антигенсвязывающий фрагмент TCR представляют собой Fab.

F4-TriNKET с антигенсвязывающими фрагментами TCR, предложенными в данном документе, обеспечивают бивалентное взаимодействие антигенов (например, пептиды ТАА, презентованные МНС), тем самым стабилизируя и поддерживая пептид ТАА на поверхности раковых клеток и усиливая цитотоксичность по отношению к раковым клеткам NK-клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения бивалентное вовлечение пептидов ТАА мультиспецифическими связывающими белками обеспечивает более высокую avidность мультиспецифических связывающих белков для раковых клеток, тем самым способствуя более сильному цитотоксическому ответу NK-клеток в отношении раковых клеток, особенно в отношении раковых клеток, представляющих низкий уровень пептида ТАА.

Понятно, что если белок по настоящему изобретению содержит scFv, V_H может быть расположен либо на С-конце, либо на N-конце V_L . Аналогичным образом, если белок по настоящему изобретению содержит фрагмент scTCR, $V\alpha$ может быть расположен либо на С-конце, либо на N-конце $V\beta$.

Иллюстративные последовательности сайта связывания NKG2D и связанного с опухолью антигенсвязывающего сайта, или антигенсвязывающих фрагментов TCR, которые могут быть включены в F3/F3' и F4-TriNKET, перечислены в данном документе.

Сайт связывания NKG2D

В табл. 1 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с NKG2D. Если не указано иное, последовательности CDR, представленные в табл. 1, определены по Кабат. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи расположены в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи слиты вместе с scFv.

NKG2D-связывающие домены могут отличаться по своей аффинности связывания с NKG2D, тем не менее все они активируют NKG2D и NK-клетки человека.

Таблица 1

Клоны	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1: GSFSGYYWS (не по Кабат) (SEQ ID NO:3) или GYYWS (SEQ ID NO:307) CDR2: EIDHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:4) CDR3: ARARGPWSFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:5) или ARGPWSFDP (SEQ ID NO:308)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLPDDFATYYCQ QYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:6)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVSSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QYGGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:8)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLPDDFATYYCQ QYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA

	DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:10)	PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QSNZYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:11)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:12)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYNSYPTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:13)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:14)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRTSQSISSYLNWYQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQ QSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:15)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:16)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYGSFPITFGGGKVEIK (SEQ ID NO:17)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:18)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPDDFATYYC QQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:19)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:20)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYNSFPITFGGGKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT

	GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:22)	CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:27)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:29)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:30)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYSSFSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)

ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:35)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:39)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:40)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYELYSYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:41)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:43)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTANYAQKFGRTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDS SIRHAYYYYGMDVWGQGTITVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQYYSTPITFGGGTK

	(SEQ ID NO:44) CDR1: GTFSSY AIS (не по Кабат) (SEQ ID NO:45) или SYAIS (SEQ ID NO:309) CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:46) CDR3: ARGDSSIRHAYYYYGMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:47) или GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:310)	VEIK (SEQ ID NO:48) CDR1: KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:49) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:50) CDR3: QQYYSTPIT (SEQ ID NO:51)
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG GSISSSSYWG WIRQPPGKLEWIGS IYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARGSDR FHPYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:52) CDR1: GSISSSSYWG (не по Кабат) (SEQ ID NO:53) или SSSYYWG (SEQ ID NO:311) CDR2: SIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:54) CDR3: ARGSDRFHPYFDY (не по Кабат) (SEQ ID NO:55) или GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:312)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSRYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQ QFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:56) CDR1: RASQSVSRYLA (SEQ ID NO:57) CDR2: DASNRAT (SEQ ID NO:58) CDR3: QQFDTWPPT (SEQ ID NO:59)
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKLEWIGEI DHSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDFATYYCE QYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:61)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGR KASGSFYYYYGMDVWGQGTITVTS S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKPLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQNDYSYPYTFGQGTK LEIK

	(SEQ ID NO:62) CDR1: GTFSSY AIS (не по Кабат) (SEQ ID NO:63) CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:64) CDR3: ARRGRKASGSFYYYGMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:65)	(SEQ ID NO:66) CDR1: ESSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO:67) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:68) CDR3: QNDYSYPYT (SEQ ID NO:69)
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKA SGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCA RGAPNYGDTTHDYY YMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO:70) CDR1: YFTSYMH (не по Кабат) (SEQ ID NO:71) или SYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:72) CDR3: ARGAPNYGDTTHDYY YMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:73) или GAPNYGDTTHDYY YMDV (SEQ ID NO:314)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSG SGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QYDDWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:74) CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:75) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:76) CDR3: QQYDDWPPT (SEQ ID NO:77)
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKA SGYTFTGYMHVVRQAPGQGLEW MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMT RDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYC ARDTGEYD TDDHGMDVWGQGT VTVSS (SEQ ID NO:78) CDR1: YFTGYMH (не по Кабат) (SEQ ID NO:79) или GYMH (SEQ ID NO:315) CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ	EIVLTQSPGTL SLSPPERATLSC RASQSVSSNLAWYQKPGQAP RLIYGASTRATGIPARFSGSGS GTEFTLTISLQSEDFAVYYCQ QDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82) CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:83) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:84) CDR3: QQDDYWPPT (SEQ ID

	ID NO:80) CDR3: ARDTGEYYDTDDHGMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:81) или DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:316)	NO:85)
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD GGYYDSGAGDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:86) CDR1: FTFSSYAMS (не по Кабат) (SEQ ID NO:87) или SYAMS (SEQ ID NO:317) CDR2: AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:88) CDR3: AKDGGYYDSGAGDY (не по Кабат) (SEQ ID NO:89) или DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:318)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFLTITSSLPEDFATYYC QQGVSYPRTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:90) CDR1: RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:91) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:92) CDR3: QQGVSYPRT (SEQ ID NO:93)
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PMGAAAGWFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:94) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPMGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:97) или GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:320)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS SGTDFLTITSSLPEDFATYYCQ QGVSPRTPFGGKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRTP (SEQ ID NO:101)
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYFTFSYMHWRQAPGQGLEW	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAP

	<p>MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTR DTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCA REGAGFAYGMDYYYMDVWGKGT VTVSS (SEQ ID NO:102) CDR1: YTFTSYYMH (не по Кабат) (SEQ ID NO:103) или SYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYAQKFG (SEQ ID NO:104) CDR3: AREGAGFAYGMDYYYMDV (не по Кабат) (SEQ ID NO:105) или EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:321)</p>	<p>RLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ QSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:106) CDR1 (SEQ ID NO:107) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:108) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:109) - QQSDNWPFT</p>
A49MI	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PIGAAAGWFDPPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:322) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPIGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:323) или GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:324)</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)</p>
A49MQ	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PQAAAGWFDPPWGQGLVTVSS</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98)</p>

	(SEQ ID NO:325) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабар) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPQAAAAGWFDP (не по Кабар) (SEQ ID NO:326) или GAPQAAAAGWFDP (SEQ ID NO:327)	CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49ML	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PLGAAAGWDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:328) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабар) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPLAAAAGWFDP (не по Кабар) (SEQ ID NO:329) или GAPLAAAAGWFDP (SEQ ID NO:330)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QQVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49MF	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVS SISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGA PFGAAAGWDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:331) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабар) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QQVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100)

	CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPFGAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:332) или GAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:333)	CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49MV	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPVAAAAGWFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:334) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPVAAAAGWFDP (не по Кабат) (SEQ ID NO:335) или GAPVAAAAGWFDP (SEQ ID NO:336)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSLWA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49-консенсуся	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPXGAAAGWFDPWGQGLVTVSS, в которой X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:337) CDR1: FTFSSYSMN (не по Кабат) (SEQ ID NO:95) или SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPXGAAAGWFDP, в которой X представляет собой M, L, I,	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSLAWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSLWA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
	V, Q или F (не по Кабат) (SEQ ID NO:338) или GAPXGAAAGWFDP, в которой X представляет собой M, L, I, V, Q или F (SEQ ID NO:339)	

Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 110, может быть соединен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO: 111, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в патенте США 9273136.

SEQ ID NO:110

QVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAFIRY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDY
WGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:111

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYDILLP
SGVSDRFSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

Альтернативно, переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 112, может быть соединен с переменным доменом легкой цепи, представленным SEQ ID NO: 113, с образованием антигенсвязывающего сайта, который может связываться с NKG2D, как проиллюстрировано в патенте США 7879985.

SEQ ID NO:112

QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDISISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS
 ANYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVVS
 S

SEQ ID NO:113

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA
 TGIPTDFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPWTFGQGTKVEIK

Ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий сайт

В контексте настоящего документа ассоциированный с опухолью означает любой антиген, включая без ограничения белок, гликопротеин, ганглиозид, углевод, липид, который ассоциирован с раком. Такой антиген может экспрессироваться на злокачественных клетках или в микроокружении опухоли, например, на ассоциированных с опухолью кровеносных сосудах, внеклеточном матриксе, мезенхимальной строме или иммунных инфильтратах. Например, ассоциированный с опухолью антиген может включать ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, мезотелин, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-альфа, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, нектин4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 и ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-кадгерин, плексин-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (или MUC1-C), плексин-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1, которые экспрессируются на раковых клетках.

Ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий сайт может быть разработан для связывания с любым ассоциированным с опухолью антигеном. В некоторых вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антигенсвязывающий сайт включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, которые могут образовывать пары для связывания с ассоциированным с опухолью антигеном. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи расположены в формате Fab. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи слиты вместе с scFv. Иллюстративные ассоциированные с опухолью антигенсвязывающие сайты перечислены ниже.

В табл. 2 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с BCMA.

Таблица 2

Клоны	Пептидная последовательность переменного домена тяжелой цепи	Пептидная последовательность переменного домена легкой цепи
1 (US14/776 649)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYSEFDYYINWVRQAPGQGLE WMGWYFASGNSEYNQKFTGRVT MTRDTSSTAYMELSSLRSEDTAV YFCASLYDYDWYFDVWGQGTMTV TVSS (SEQ ID NO:114) CDR1(SEQ ID NO:115) - DYYIN CDR2 (SEQ ID NO:116) - WYFASGNSEYNQKFTG CDR3 (SEQ ID NO:117) - LYDYDWYFDV	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCKS SQSLVHNSGNTYLHWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GADFTLKISRVEAEDVGVYYCAE TSHVPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:118) или DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKS SQSLVHNSGNTYLHWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGIYYCSQS SIYPWTFGQGTKLEIK

		(SEQ ID NO:119) CDR1(SEQ ID NO:120) - KSSQSLVHSNGNTYLH CDR2 (SEQ ID NO:121) - KVSNRFS CDR3 - AETSHVPWT (SEQ ID NO:122) или SQSSIYPWT (SEQ ID NO:123)
2 (PCT/US15 /64269)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYFTFDYSINWVKRAPGKGLKW MGWINTETREPAYAYDFRGRFAF SLETSASTAYLQINNLKYEDTATY FCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:124) CDR1 (SEQ ID NO:125) - DYSIN CDR2 (SEQ ID NO:126) - WINTETREPAYAYDFR CDR3 (SEQ ID NO:127) - DYSYAMDY	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCR ASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPP TLTIQLASNVQTGVPARFSGSGSR TDFTLTIDPVEEDDVA VYYCLQSR TIPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:128) CDR1 (SEQ ID NO:129) - RASESVTILGSHLIH CDR2 (SEQ ID NO:130) - LASNVQT CDR3 (SEQ ID NO:131) - LQSR TIPRT
3 (US14/122 391)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCK ASGTF SNSYWMHWVRQAPGQGL EWMGATYRGHSDTYYNQKFKGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCARGAIYNGYDVL DNWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:132) CDR1 (SEQ ID NO:133) - NYWMH CDR2 (SEQ ID NO:134) - ATYRGHSDTYYNQKFKG CDR3 (SEQ ID NO:135) - GAIYNGYDVL DN	DIQMTQSPSSLASV GDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLL IYYT SNLHSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYRKLP WTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:136) CDR1 (SEQ ID NO:137) - SASQDISNYLN CDR2 (SEQ ID NO:138) - YTSNLHS CDR3 (SEQ ID NO:139) - QQYRKLPWT
4 (US201700 51068)	QLQLQESGPGLVKPS ETL SLTCTV SGGSISSSSYFWGWIRPPGKGLE WIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARHDGATAGLFDYWGQGLVT	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGG NNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVV VYDDSDRPSGIPER FSGNSGNTA TLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSS SDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID
	VSS (SEQ ID NO:140) CDR1: SSSYFWG (SEQ ID NO:141) CDR2: SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO:142) CDR3: HDGATAGLFDY (SEQ ID NO:143)	NO:144) CDR1: GGNNIGSKSVH (SEQ ID NO:145) CDR2: DDSDRPS (SEQ ID NO:146) CDR3: QVWDSSSDHVV (SEQ ID NO:147)
5 (WO20170 21450)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLE WVSAISGPGSSSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKVLGWFDYWGQGLVTVS S (SEQ ID NO:148) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:149) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:150) CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:151)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLL IHSASTRATGIPDRFSGSGSGTDF LAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPD FTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:152) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:153) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:154) CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:155)

Альтернативно, ВСМА-связывающий домен может включать переменный домен тяжелой цепи и

вариабельный домен легкой цепи, как указано ниже в EM-801 и EM-901.

Вариабельный домен тяжелой цепи EM-801 (SEQ ID NO: 157):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS~~WVRQAPGKGLEWVSAISGS~~

GG

CDR1 CDR2

STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF~~FDYWGQ~~

GTL CDR3

VTVSS

Вариабельный домен легкой цепи EM-801 (SEQ ID NO: 158):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRA

TGI

CDR1 CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

CDR3

Вариабельный домен тяжелой цепи EM-901 (SEQ ID NO: 159)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGP

GS CDR1 CDR2

STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWF~~FDYWGQ~~

GTL CDR3

VTVSS

Вариабельный домен легкой цепи EM-901 (SEQ ID NO: 160)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQKPGQAPRLLIHSASTRA

TGI CDR1 CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLAIISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

CDR3

Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с BCMA, могут быть идентифицированы с помощью скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO: 156.

SEQ ID NO:156

MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNA
ILWTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRGTGDEILP
RGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVSDHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATE
IEKSISAR

В табл. 3 перечислены пептидные последовательности вариабельных доменов тяжелой цепи и вариабельных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с CD33. CD33-связывающие домены могут различаться по своей аффинности связывания с CD33.

Таблица 3

	Пептидная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи	Пептидная последовательность вариабельного домена легкой цепи
ADI-10159 [Ab1] (G59)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAREGGP YYDSSGYFVYYGMDVWGQG TTVTVSS [SEQ ID NO:161] CDR1: FTFSSYGMS [SEQ ID NO:162] CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:163] CDR3:	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCR ASQSISSWLAWYQKPGKAPKLL IYDASSLES GVPSRFSGSGSGTEF TLTISLQPD DFATYYCQYESFP TFGGGTKVEIK [SEQ ID NO165] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:166] CDR2: DASSLES [SEQ ID NO:167] CDR3: QQYESFPT [SEQ ID NO:168]

046081

	AREGGPYDSSGYFVYYGMD V [SEQ ID NO:164]	
ADI-10177 [Ab2]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARPLNA GELDVWGQGTMTVTVSS [SEQ ID NO:169] CDR1: FTSSYWMS [SEQ ID NO:170] CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:171] CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:172]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASSLESVPSRFRSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQLESYPL TFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:173] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:174] CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:175] CDR3: QQLESYPLT [SEQ ID NO:176]
ADI-11776 [Ab3] (H76)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSKYTMSWVRQAP GKGLEWVSAIVSGGESTYFAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAREGGPY YDSSGYFVYYGMDVWGQGT TVTVSS [SEQ ID NO:177] CDR1: FTFSKYTMS [SEQ ID NO:178] CDR2: AIVSGGESTYFADSVKG [SEQ ID NO:179] CDR3: AREGGPYDSSGYFVYYGMD V [SEQ ID NO:180]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESVPSRFRSGSGSGTEF TLTISSLQPDDFATYYCQQYDDL PTFGGTKVEIK [SEQ ID NO:181] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:182] CDR2: KASSLES [SEQ ID NO:183] CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:184]
ADI-11801	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFSYYMHWRQA	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRS SQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQ

[Ab4]	<p>PGQGLEWGMINPSWGSTSY AQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDTAVYYCAREAA DGFVGERYFDLWGRGTLVTV SS [SEQ ID NO:185] CDR1: YTFSDYYMH [SEQ ID NO:186] CDR2: MINPSWGSTSYAQKFQG [SEQ ID NO:187] CDR3: AREAADGFVGERYFDL [SEQ ID NO:188]</p>	<p>SPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCM QDVALPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:189] CDR1: RSSQSLLYSNGYNYLD [SEQ ID NO:190] CDR2: LGSNRAS [SEQ ID NO:191] CDR3: MQDVALPIT [SEQ ID NO:192]</p>
<p>ADI-11807 [Ab5] (107)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGSYWMSWVRQAP GKGLEWVATIKQDGSEKSYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARPLNA GELDVWGQGMVTVSS [SEQ ID NO:193] CDR1: FTFGSYWMS [SEQ ID NO:194] CDR2: TIKQDGSEKSYVDSVKG [SEQ ID NO:195] CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:196]</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASSLESGVPSRFGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQSQSYPP ITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:197] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:198] CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:199] CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID NO:200]</p>
<p>ADI-11809 [Ab6]</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFPSYWMSWVRQAP GKGLEWVATIKRDGSEKGYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARPLNA GELDVWGQGMVTVSS [SEQ</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYEASSLESGVPSRFGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQSQSYPP ITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:205] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID</p>

	<p>ID NO:201]</p> <p>CDR1: FTFPSYWMS [SEQ ID NO:202]</p> <p>CDR2: TIKRDGSEKGYVDSVKG [SEQ ID NO:203]</p> <p>CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:204]</p>	<p>NO:206]</p> <p>CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:207]</p> <p>CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID NO:208]</p>
<p>ADI-11815 [Ab7]</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFGTYMHWRQA PGQGLEWMGIINPSRGSTVYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDTAVYYCARGAGY DDEDMDVWGKTTTVSS [SEQ ID NO:209]</p> <p>CDR1: YTFGTYMH [SEQ ID NO:210]</p> <p>CDR2: IINPSRGSTVYAQKFQG [SEQ ID NO:211]</p> <p>CDR3: ARGAGYDDEDMDV [SEQ ID NO:212]</p>	<p>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCR ASQGIDSWLAWYQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQAHSY PLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:213]</p> <p>CDR1: RASQGIDSWLA [SEQ ID NO:214]</p> <p>CDR2: AASSLQS [SEQ ID NO:215]</p> <p>CDR3: QQAHSYPLT [SEQ ID NO:216]</p>
<p>ADI-11819 [Ab8]</p>	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSSISSSEGIYYADS VKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREGGPYY DSSGYFVYYGMDVWGQGTTV TVSS [SEQ ID NO:217]</p> <p>CDR1: FTFSSYAMS [SEQ ID NO:218]</p> <p>CDR2: SISSSEGIYYADSVKG</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASNSISSWLAWYQKPGKAPKLL IYEASSTKSGVPSRFSGSGGTEF TLTISSLQPDFATYYCQYDDL PTFGGTKVEIK [SEQ ID NO:221]</p> <p>CDR1: RASNSISSWLA [SEQ ID NO:222]</p> <p>CDR2: EASSTKS [SEQ ID NO:223]</p> <p>CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:224]</p>

	[SEQ ID NO:219] CDR3: AREGGPYDSSGYFVYYGMD V [SEQ ID NO:220]	
ADI-11830 [Ab9]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANINTDGSEVYYV DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDVGP GIA YQG HFDYWGQGLVTVS S [SEQ ID NO:225] CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:226] CDR2: NINTDGSEVYYVDSVKG [SEQ ID NO:227] CDR3: ARDVGP G IAYQGHFDY [SEQ ID NO:228]	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR ASQVIYSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLKSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQVYDT PLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:229] CDR1: RASQVIYSYLN [SEQ ID NO:230] CDR2: AASSLKS [SEQ ID NO:231] CDR3: QQVYDTPLT [SEQ ID NO:232]
ADI-11835 [Ab10] (I35)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTC TVSGGSISSTDYYWGWRQPP GKGLEWIGSIGYSGTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARETAHDVHG MDVWGQGTITVTVSS [SEQ ID NO:233] CDR1: GSISSTDYYWG [SEQ ID NO:234] CDR2: SIGYSGTYYNPSLKS [SEQ ID NO:235] CDR3: ARETAHDVHGMDV [SEQ ID NO:236]	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASHSVYSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQYDNL PTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:237] CDR1: RASHSVYSYLA [SEQ ID NO:238] CDR2: DASNRAT [SEQ ID NO:239] CDR3: QQYDNLPT [SEQ ID NO:240]
Линтузумаб	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR

	CKASGYTFTDYNMHWVRQAP GQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQ KFKSKATITADESTNTAYMEL SSLRSEDТАVYYCARGRPAMD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:241) CDR1 (SEQ ID NO:242) - GYTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:243) - YIYPYNGGTG CDR3 (SEQ ID NO:244) - GRPAMDY	ASEVDNYGISFMNWFQKPGK APKLLIYAASNQSGVPSRFSGSG SGTDFLTISLQPDFATYYCQQ SKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:245) CDR1 (SEQ ID NO:246) - ESVDNYGISFMN CDR2 (SEQ ID NO:247) - AASNQGS CDR3 (SEQ ID NO:248) - QQSKEVPWT
Гемтузумаб	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGYTITDSNIHWVRQAPG QSLEWIGYIYPYNGGTDYNQK FKNRATLTVDNPTNTAYMELS SLRSEDТАFYVCVNGNPWLA YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:249) CDR1 (SEQ ID NO:250) - GYTITDS CDR2 (SEQ ID NO:251) - YIYPYNGGTD CDR3 (SEQ ID NO:252) - GNPWLAY	DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCR ASESLDNYGIRFLTWFQKPGKA PKLLMYAASNQSGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPDFATYYCQQ TKEVPWSFGQGTKVEVK (SEQ ID NO:253) CDR1 (SEQ ID NO:254) - ESLDNYGIRFLT CDR2 (SEQ ID NO:255) - AASNQGS CDR3 (SEQ ID NO:256) - QQTKEVPWS
анти-CD33 (US 7557189)	QVQLQQPGAЕVVKPGASVKM SCKASGYTFTSYIHWIKQTPG QGLEWVGVIYPGNDISYNQK FQ GKATLTADKSSTAYMQLS SLTSEDSAVYYCAREVRLRYF DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:257) CDR1 (SEQ ID NO:258) -	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMCK SSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPG QSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGS GSGTDFLTISVQPEDLAIYYCH QYLSSRTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:261) CDR1 (SEQ ID NO:262) - QSVFFSSSQKNYLA
	GYTFTSY CDR2 (SEQ ID NO:259) - YPGND CDR3 (SEQ ID NO:260) - EVRLRYFDV	CDR2 (SEQ ID NO:263) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:264) - HQYLSRT
вадасукусимаб (US 13/804227)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYDINWVRQAP GQGLEWIGWIYPGDGSKYNE KFKAKATLTADTSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCASYEDA MDYWGQGTTVTVSSA (SEQ ID NO:265) CDR1 (SEQ ID NO:266): GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO:267): YPGDGS CDR3 (SEQ ID NO:268): GYEDAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRTINCK ASQDINSYLSWFQKPKGKAPKTL IYRANRLVDGVPSPRFSGSGSQD YTLTISLQPEDFATYYCLQYDEF PLTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:269) CDR1 (SEQ ID NO:270): QDINSYLS CDR2 (SEQ ID NO:271): RANRLVD CDR3 (SEQ ID NO:272): LQYDEFPLT

Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с CD33, могут быть

идентифицированы с помощью скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, определенной SEQ ID NO: 273.

SEQ ID NO:273

MPLLLLLPLLWAGALAMPNFWLQVQESVTVQEGLCCLVLPCTFFHPIPYDKNS
 PVHGYWFREGAIIISRDSPVATNKLQDEVQEETQGRFRLGDPSSRNCSLSIVDARRRDN
 GSYFFRMERGSTKYSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCVSWACEQGT
 PPIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTERTIQLNVTYV
 PQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRKAARTAV
 GRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSK
 DTSTEYSEVRTQ

В табл. 4 перечислены пептидные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и переменных доменов легкой цепи, которые в комбинации могут связываться с HER2.

Таблица 4

Клоны	Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи	Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи
Трастузума 6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNKIDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGLV TVSS (SEQ ID NO:274) CDR1 (SEQ ID NO:275) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:276) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:277) - WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTITSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:278) CDR1 (SEQ ID NO:279) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:280) - SASFLYS CDR3 (SEQ ID NO:281) - QQHYTPPT
Пертузумаб	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEW VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLS VDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNLGPSFYFDYWGQGLVTV SSA (SEQ ID NO:282) CDR1 (SEQ ID NO:283) - GFTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:284) - NPNSGG CDR3 (SEQ ID NO:285) - NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC KASQDVSIGVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASYRYTGVPSPRFSGSGS GTDFLTITSLQPEDFATYYCQQ YYIYPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:286) CDR1 (SEQ ID NO:287) - QDVSIGVA CDR2 (SEQ ID NO:288) - SASYRYT CDR3 (SEQ ID NO:289) - QQYYIYPY
МGAH22 (US 8802093)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCA SGFNKIDTYIHWVKQRPEQGLEWI GRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITA DTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYC	DIVMTQSHKFMSTSVGDRTVITC KASQDVNTAVAWYQQKPGHSP KLLIYSASFRYTGVPDRFTGSR GTDFLTITSSVQAEDLAVYYCQ
	SRWGGDGFYAMDYWGQGSVTV SSA (SEQ ID NO:290) CDR1 (SEQ ID NO:291) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:292) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:293) - WGGDGFYAMDY	QHYTPPTFGGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:294) CDR1 (SEQ ID NO:295) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:296) - SASFRYT CDR3 (SEQ ID NO:297) - QQHYTPPT

Альтернативно, новые антигенсвязывающие сайты, которые могут связываться с HER2, могут быть идентифицированы с помощью скрининга на связывание с аминокислотной последовательностью, опре-

деленной SEQ ID NO: 298.

MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTMKLRLLPASPETHLDMRLHLYQGC
 QVVQGNLELYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNVQRVPLQRLRIVRGTQLFEDNY
 ALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDI
 FHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGP
 LPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRY
 TFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGM
 EHLREVRVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITG
 YLYISAWPDSLPLDSVFNQLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWGLRSLRELGSGLALIH
 HNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPT
 QCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQC
 VACAHYKDPFCVARCPGKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGPC
 AEQRASPLTSIISAVVGVVLLVGVVFGILIKRRQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSG
 AMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKA
 NKEILDEAYVMAGVGSPLYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQD
 LLNWCMIKAGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHA
 DGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEK
 GERLPQPPICTIDVYMMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEGLGPA
 SPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFPCDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSG
 GGDLTGLPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLRYSE
 DPTVPLSETDGYVAPLTCSPQPEYVNPQDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSP
 GKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPOGGAAPQHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAP
 PSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV (SEQ ID NO:298).

Антигенсвязывающий фрагмент TCR может быть разработан для связывания ассоциированного с опухолью антигенного пептида, презентованного МНС. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент TCR включает вариабельный домен альфа-цепи и вариабельный домен бета-цепи, которые могут образовывать пары для связывания с пептидом ТАА, презентованным МНС. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен альфа-цепи и вариабельный домен бета-цепи расположены в формате внеклеточного фрагмента TCR. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен альфа-цепи и вариабельный домен бета-цепи слиты вместе с фрагментом scTCR.

Неограничивающие примеры белков, которые могут быть преобразованы в TCR-нацеленные пептиды ТАА, включают антигены тканевой дифференциации (например, MART-1, gp100, CEA, CD19 и тирозиназу), антигены зародышевой линии опухоли (например, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A12, MAGE-C2, BAGE1, GAGE1, CTAG1, CTAG2, XAGE-1B и SSX2), нормальные белки, сверхэкспрессируемые раковыми клетками, (например, hTERT, EGFR, ERBB2, WT1, MUC1 и мезотелин), вирусные белки (например, HPV, EBV, и MCC) опухолеспецифичные мутировавшие антигены. Иллюстративные ассоциированные с опухолью антигенсвязывающие сайты перечислены ниже.

В табл. 5 перечислены пептидные последовательности мишеней TCR и соответствующие последовательности альфа-цепи и бета-цепи TCR.

Таблица 5

Целевой белок и пептид, презентованный МНС	Внеклеточный фрагмент TCR α переменный домен α -цепи (V α) CDR3 цепи α (CDR3 α)	Внеклеточный фрагмент TCR-бета переменный домен β -цепи (V β) CDR β -цепи (CDR3 β)
ELAVL4 (UniProt ID P26378) LGYGFVNYI (SEQ ID NO:425) презентованный HLA-A*02:01:48	KEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGK SPELIMSIYNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLIRDSQPSDS ATYLCAVTTDSWGKLQFGA GTQVVVTPDIQNPDPVAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:349) V α : KEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGK SPELIMSIYNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLIRDSQPSDS	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPMGL RLIHYSVGAGITDQGEVPGYNYV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF CASRPLAGGRPEQYFGPGTRLT VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWWNGKEVHSGVSTDPQLKEQ PALNDSRYALSSRLRVSATFWQD PRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTVIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:350) V β : NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPMGL RLIHYSVGAGITDQGEVPGYNYV

	ATYLCAVTTDSWGKLGFGA GTQVVVTPDIQNP (SEQ ID NO:351) CDR3 α : CAVTTDSWGKLGQF (SEQ ID NO:353)	SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYF CASRPGLAGGRPEQYFGPGTRLT VTEDLKNVF (SEQ ID NO:352) CDR3 β : CASRPGLAGGRPEQYF (SEQ ID NO:354)
Инсулин (UniProt ID P01308) ALWGPDPAААА (SEQ ID NO:426) презентованный HLA-A*02:01:48	EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMRGDSSYKLIFGS GTRLLVRPDIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDVYITDKCVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:355) V α : EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMRGDSSYKLIFGS GTRLLVRPDIQNP (SEQ ID NO:357) CDR3 α : CAMRGDSSYKLIF (SEQ ID NO:359)	AGVIQSPRHEVTEMGQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAK MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFC ASSLWEKLAKNIQYFGAGTRLSV LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQP ALNDSRYALSSRLRVSATFWQDP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:356) V β : AGVIQSPRHEVTEMGQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAK MPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFC ASSLWEKLAKNIQYFGAGTRLSV LEDLKNVF (SEQ ID NO:358) CDR3 β : CASSLWEKLAKNIQYF (SEQ ID NO:360)
TERT (UniProt ID O14746) ILAKFLHWL (SEQ ID NO:340) презентованный HLA-A*02:01:48	IQVEQSPDDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLWWFHQNPWG QLINLFYIPSGTKQNGRLSAT TVATERYSLLYISSQTDSG VYFCAVDSATALPYGYIFGT GTRLKVLANIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT	AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSIHPEYTDQGEVPNGYNVS RSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYQGTEAFFGQGTRLTVVEDL NKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKA TLVCLATGFYPDHVELSWVWNG

	<p>NVSQSKSDVYITDKCVLDM RSMDFKNSAVAWSNKSD ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:361)</p> <p>Vα: IQVEQSPDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLWWFHQNPWG QLINLFYIPSGTKQNGRLSAT TVATERYSLLYISSQTDSG VYFCVDSATALPYGYIFGT GTRLKVLANIQNP (SEQ ID NO:363)</p> <p>CDR3α: CAVDSATALPYGYIF (SEQ ID NO:365)</p>	<p>KEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS RYALSSRLRVSATFWQDPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:362)</p> <p>Vβ: AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSIHPEYTDQGEVPNGYNVS RSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYQGTEAFFGQGTRLTVVEDL NKVF (SEQ ID NO:364)</p> <p>CDR3β: CASSYQGTEAFF (SEQ ID NO:366)</p>
<p>ERBB2 (UniProt ID P04626) KIFGSLAFL (SEQ ID NO:341) презентованный HLA-A*02</p>	<p>EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSLYYGGSQGNLI FGKGTKLSVKPDAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKSDVYITDKCVLDMRS MDFKNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:428)</p> <p>Vα: EVEQDPGPLSVPEGAIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSLYYGGSQGNLI FGKGTKLSVKP (SEQ ID NO:430)</p>	<p>AGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCN PISGHATLYWYQQILGQGPKLLI QFQNGVVDSSQLPKDRFSAER LKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC ASSLEIFGGIADTDTQYFGPGRRL TVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWWNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYALSSRLRVSATFWQ DPRNHFRFCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:429)</p> <p>Vβ: AGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCN PISGHATLYWYQQILGQGPKLLI QFQNGVVDSSQLPKDRFSAER LKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC ASSLEIFGGIADTDTQYF GPGTRRLTVLEDLKNVF (SEQ ID</p>

	CDR3 α : CAMSLYGGSQGNLIF (SEQ ID NO:367)	NO:431) CDR3 β : CASSLEIFGGIADTDQYF (SEQ ID NO:368)
WT1 (UniProt ID P19544) RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342) презентованный HLA-A*02	EVEQNSGPLSVPEGAIASLNC TYSDRGSQSFVYRQYSGKS PELIMFIYSNGDKEDGRFTAQ LNKASQYVLLIRDSQPSDSA TYLCAVNDQGGGADGLTFG KGTHLIQPDPAVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KSDSDVYITDKCVLDMRSMD FKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:432) V α : EVEQNSGPLSVPEGAIASLNC TYSDRGSQSFVYRQYSGKS PELIMFIYSNGDKEDGRFTAQ LNKASQYVLLIRDSQPSDSA TYLCAVNDQGGGADGLTFG KGTHLIQP (SEQ ID NO:434) CDR3 α : CAVNDQGGGADGLTF (SEQ ID NO:369)	NAGVTQTPKFRVLKTGQSMILL CAQDMNHEMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGYN VSRLKKQNFLGLESAAPSQTSV YFCASSWWDTGELFFGEGSRLTV LEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQP ALNDSRYALSSRLRVSATFWQDP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:433) V β : NAGVTQTPKFRVLKTGQSMILL CAQDMNHEMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGYN VSRLKKQNFLGLESAAPSQTSV YFCASSWWDTGELFFGEGSRLTV LEDLKNVF (SEQ ID NO:435) CDR3 β : CASSWWDTGELFF (SEQ ID NO:370)
WT1 (UniProt ID P19544) RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342) презентованный HLA-A*02	AQSVTQLGSHVSVSEGAIVL LRCNYSSVPPYLFVYVQYP QGLQLLLKYTSAATLVKGIN GFEAEFKKSETSFHLTKPSAH MSDAAEYFCAVSEGGDYKL SFGAGTTVTVRADPAVYQLR DSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKSDVYITDKCVLDMR	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC AWGTLATEQYFGPGTRTLVTED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN

	<p>SMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:436)</p> <p>Vα: AQSVTQLGSHVSVSEGA LVL LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP QGLQLLKYSAAATLVKGIN GFEAEFKKSETSFHLTKPSAH MSDAAEYFCVSEGGDYKL SFGAGTTVTVRA (SEQ ID NO:438)</p> <p>CDR3α: CAVSEGGDYKLSF (SEQ ID NO:371)</p>	<p>DSRYALSSRLRVSATFWQDPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:437)</p> <p>Vβ: DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL ECL VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDPIEGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC AWGTLATEQYFGPGTRTLVTE DLK LKNVF (SEQ ID NO:439)</p> <p>CDR3β: CAWGTALATEQYF (SEQ ID NO:372)</p>
<p>MAGE-A3 (UniProt ID P43357) CASSFNMATGQ YF (SEQ ID NO:343) презентованный HLA-A1</p>	<p>AQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLYVRPYQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCVVRPGGAGPFF VVFVGKTKLSVIPNIQNP DPA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKSDVYITDKC VLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIP (SEQ ID NO:373)</p> <p>Vα: AQEVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLYVRPYQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCVVRPGGAGPFF VVFVGKTKLSVIPNIQNP (SEQ ID NO:375)</p> <p>CDR3α: CAVRPGGAGPFF</p>	<p>AGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCS PISGHRVSWYQQTPGQGLQFLF EYFSETQRNKGNFGRFSGRQFS NSRSEMNVSTLELGDSALYLCAS SFNMATGQYFGPGTRTLVTE DLK NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWVWNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSR YALSSRLRVSATFWQDPRNH FRC QVQFYGLSENDEWTQDRAK PVT QIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:374)</p> <p>Vβ: AGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCS PISGHRVSWYQQTPGQGLQFLF EYFSETQRNKGNFGRFSGRQFS NSRSEMNVSTLELGDSALYLCAS SFNMATGQYFGPGTRTLVTE DLK NVF (SEQ ID NO:376)</p> <p>CDR3β: CASSFNMATGQYF (SEQ</p>

	(SEQ ID NO:377)	ID NO:378)
MART1 (UniProt ID Q16655) EAAGIGILTV (SEQ ID NO:344) презентованный HLA-A2	EVEQDPGPLSVPEGAIIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSETGGFKTIFGA GTRLFVKANIQNPDPVAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDVYITDKTVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSD ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:379) V α : EVEQDPGPLSVPEGAIIVSLNC TYSNSAFQYFMWYRQYSRK GPELLMYTYSSGNKEDGRFT AQVDKSSKYISLFIRDSQPSD SATYLCAMSETGGFKTIFGA GTRLFVKANIQNP (SEQ ID NO:381) CDR3 α : CAMSETGGFKTIF (SEQ ID NO:383)	EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLR QIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKV SRKEKRNFPILIESPSPNQTSLYF CASSLVGTAGSPLHFGNGTRLTV TEDLNKVFPEPEAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTVIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:380) V β : EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLR QIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKV SRKEKRNFPILIESPSPNQTSLYF CASSLVGTAGSPLHFGNGTRLTV TEDLNKVF (SEQ ID NO:382) CDR3 β : CASSLVGTAGSPLHF (SEQ ID NO:384)
SSX2 (UniProt ID Q16385) KASEKIFYV (SEQ ID NO:345) презентованный HLA-A2	CDR3 α : CAMTSGFGNEKLT (SEQ ID NO:387)	CDR3 β : CATSRGQGGQPQHF (SEQ ID NO:388)
BIRC5, также называется сурвивин (UniProt ID O15392)	GESVGLHLPTLSVQEGDNSII NCAYSNSASDYFIWYKQESG KGPQFIIDIRSNMDKRQGQR VTVLLNKTVKHLSLQIAATQ PGDSAVYFCAENCAETVTDS	DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSC SQTLNHNVMYWYQKSSQAPKL LFHYDVKDFNNEADTPDNFQSR RPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYL CATSRGDSTAEPQHFQGDGTRLSIL

<p>ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346) презентованный HLA-A2</p>	<p>WGKLQFGAGTQVVVTPDPA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSN KSDFACANAFNNSIIPEDTFF PS (SEQ ID NO:440) Vα: GESVGLHLPVLSVQEGDNSII NCAYSNSASDYFIWYKQESG KGPQFIIDIRSNMDKRQGQR VTVLLNKTVKHLSLQIAATQ PGDSAVYFCAENCAETVTDS WGKLQFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO:442) CDR3α: CAETVTDSWGKLQF (SEQ ID NO:389)</p>	<p>EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPA LNDSRYALSSRLRVSATFWQDPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:441) Vβ: DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTLSC SQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKL LFHYDVKDFNNEADTPDNFQSR RPNTSFCFLDIRSPGLDAAMYL CATSRGDSTAEPQHFQDGRSLIL EDLNKVF (SEQ ID NO:443) CDR3β: CATSRGDSTAEPQHF (SEQ ID NO:390)</p>
<p>BIRC5, также называется сурвивин (UniProt ID O15392) ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346) презентованный HLA-A2</p>	<p>AQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSQSYGLFWYKQ PSSGEMIFLIYQGSYDEQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVIS ASQLGDSAMYFCAMREGGG YNKLIFGAGTRLAVHPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVVSQSKSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:385) Vα: AQKITQTQPGMFVQEKEAVT LDCTYDTSQSYGLFWYKQ PSSGEMIFLIYQGSYDEQNAT EGRYSLNFQKARKSANLVIS ASQLGDSAMYFCAMREGGG</p>	<p>SQTIHQWPATLVQPVGSPLSLEC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQ LLFYSVGIGQISSEVPQNLSASRP QDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAG QDLNTEAFFGQGTRTLVVEDLN KVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKAT LVCLATGFYPDHVELSWWVNGK EVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSR YALSSRLRVSATFWQDPRNHFRC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:386) Vβ: SQTIHQWPATLVQPVGSPLSLEC TVEGTSNPPLYWYRQAAGRGLQ LLFYSVGIGQISSEVPQNLSASRP QDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAG</p>

	YMKLIFGAGTRLAVHP (SEQ ID NO:444) CDR3 α : CAMREGGGYNKLIF (SEQ ID NO:391)	QDLNTEAFFGQGTRLTVVEDLN KVF (SEQ ID NO:445) CDR3 β : CAGQDLNTEAFF (SEQ ID NO:392)
PRAME (UniProt ID P78395) QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) презентованный HLA-A2	AQSVTQLGSHVSVSERALVLR LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP NQGLQLLLKYTSAATLVKGI NGFEAEFKKSETSFHLTKPSA HMSDAAEYFCAVSGQTGAN NLFFGTGTRLTVIPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKSDVYITDK TVLDMRSMDFKSNSAVAWS NKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPS (SEQ ID NO:393) V α : AQSVTQLGSHVSVSERALVLR LRCNYSSSVPPYLFWYVQYP NQGLQLLLKYTSAATLVKGI NGFEAEFKKSETSFHLTKPSA HMSDAAEYFCAVSGQTGAN NLFFGTGTRLTVIPYIQNP (SEQ ID NO:395) CDR3 α : CAVSGQTGANNLF (SEQ ID NO:397)	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSLELGDSALYFCA SARWDRGGGEQYFGPGTRLTVTE DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:394) V β : DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSLELGDSALYFCA SARWDRGGGEQYFGPGTRLTVTE DLKNVF (SEQ ID NO:396) CDR3 β : CASARWDRGGGEQYF (SEQ ID NO:398)
PRAME (UniProt ID P78395) QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) презентованный HLA-A2	GQQLNQSPQSMFIQEGEDVSM MNC TSSSIFNTWLWYKQDPG EGPVLLIALYKAGELT SNGR LTAQFGITRKDSFLNISASIPS DVGIYFCAGIPRDNYGQNFV FGPGTRLSVLPYIQNPDPVAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDVYITDKTVL	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECS VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC ASTPWLAGGNEQFFGPGTRLTVL EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQLKEQPAL

	DMRSMDFKNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:399) V α : GQQLNQSPQSMFIQEGEDVS MNCTSSSIFNTWLWYKQDPG EGPVLLIALYKAGELTSNGR LTAQFGITRKDSFLNISASIPS DVGIFYFCAGIPRDNYGQNFV FGPGTRLSVLPYIQNP (SEQ ID NO:401) CDR3 α : CAGIPRDNYGQNFVF (SEQ ID NO:403)	NDSRYCLSSRLRVSATFWQNP HFRQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:400) V β : DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLR LIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVS REKKERFSLILESASTNQTSMYLC ASTPWLAGGNEQFFGPGTRLT EDLKNVF (SEQ ID NO:402) CDR3 β : CASTPWLAGGNEQFF (SEQ ID NO:404)
PRAME (UniProt ID P78395) QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) презентованный HLA-A2	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMFIYNSGDKEDGRFT AQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAVKDNAGNMLTF GGGTRLMVKPHIQNPDAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDVYITDKTVL DMRSMDFKNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:405) V α : QKEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMFIYNSGDKEDGRFT AQLNKASQYVSLIRDSQPS DSATYLCAVKDNAGNMLTF GGGTRLMVKPHIQNP (SEQ ID NO:407) CDR3 α : CAVKDNAGNMLTF	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSLELGDSALYFCA SSDGGGVYEQYFGPGTRLT VTEDE LKNVFPPEVAVFEPEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWN GKEVHSGVSTDPOPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:406) V β : DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQF LIQYYNGEERAKGNILERFSAQQ FPDLHSELNLSLELGDSALYFCA SSDGGGVYEQYFGPGTRLT VTEDE LKNVF (SEQ ID NO:408) CDR3 β : CASSDGGGVYEQYF

	(SEQ ID NO:409)	(SEQ ID NO:410)
NY-ESO-1 (UniProt ID P78358) SLLMWITQC (SEQ ID NO:348) презентованный HLA-A*02:01:48	QEVTQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGR NASLDKSSGRSTLYIAASQPG DSATYLCAVRPTSGGSYIPTF GRGTSLIVHPYIQNPDPVYQ LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKSDVYITDKCVLDM RSMDFKNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPS (SEQ ID NO:411) V α : QEVTQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGR NASLDKSSGRSTLYIAASQPG DSATYLCAVRPTSGGSYIPTF GRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:413) CDR3 α : CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRVALSSRLRVSATFWQDPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:412) V β : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVF (SEQ ID NO:414) CDR3 β : CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)
NY-ESO-1 (UniProt ID P78358) SLLMWITQC (SEQ ID NO:348) презентованный HLA-A*02:01:48	KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GGKLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSAGSSTLYIAASQP GDSATYLCAVRPTSGGSYIPT FGRGTSLIVHPYIQNPDPVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDVYITDKCVL DMRSMDFKNSAVAWSNKSE DFACANAFNNSIIPEDTFFP SE (SEQ ID NO:417)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWWVN GKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRVALSSRLRVSATFWQDPRNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID

	<p>Vα:</p> <p>KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSTFDSAIFYNLQWFRQDP GGKLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSAGSSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPTSGGSYIPT FGRGTS LIVHPYIQNP (SEQ ID NO:418)</p> <p>CDR3α: CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)</p>	<p>NO:412)</p> <p>Vβ:</p> <p>GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCA SSYVVGNTGELFFGEGSRLTVLED LKNVF (SEQ ID NO:414)</p> <p>CDR3β: CASSYVGTGELFF (SEQ ID NO:416)</p>
<p>NY-ESO-1 (UniProt ID P78358)</p> <p>SLLMWITQC (SEQ ID NO:348)</p> <p>презентованный HLA-A*02:01:48</p>	<p>KQEVTVIPAALSVPEGENLV LNCSTFDSAIFYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGSSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPLLDGTYIP TFGRGTS LIVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKSDVYITDKCV LDMRSMDFKSNSAVAVWSNK SDFACANAFNNS (SEQ ID NO:419)</p> <p>Vα:</p> <p>KQEVTVIPAALSVPEGENLV LNCSTFDSAIFYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSGR LNASLDKSSGSSTLYIAASQP GDSATYLC AVRPLLDGTYIP TFGRGTS LIVHPYIQNP (SEQ ID NO:421)</p> <p>CDR3α: CAVRPLLDGTYIPTF (SEQ ID NO:423)</p>	<p>GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVS RSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLE DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWVW NGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL NDSRYALSSRLRVSATFWQDPRN HFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:420)</p> <p>Vβ:</p> <p>GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVS RSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLE DLKNVF (SEQ ID NO:422)</p> <p>CDR3β: CASSYLGNTGELFF (SEQ ID NO:424)</p>

Константная область антитела и гетеродимеризация

Константная область антитела (домен Fc), описанная в настоящем изобретении, может происходить из константной области антитела любого вида, которое связывается с CD16. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область IgG2, константная область IgG3 или константная область IgG4. В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области по меньшей мере на 90% идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кот, мышь или лошадь. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает шарнир, домен CH2, домен CH3 и, необязательно, домен CH1. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела, которая включает шарнир, домен CH2, домен CH3 и, необязательно, домен CH1, происходит из антитела IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления константная область антитела включает аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

В Fc-домене связывание CD16 опосредовано шарнирной областью и доменом CH2. Например, в человеческом IgG1 взаимодействие с CD16 в первую очередь сосредоточено на аминокислотных остатках Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239 и углеводном остатке N-ацетил-D-глюкозамин в домене CH2 (см. Sondermann et al., Nature, 406 (6793):267-273). Основываясь на известных доменах, мутации могут быть выбраны для повышения или понижения аффинности связывания с CD16, например, используя библиотеки фагового дисплея или библиотеки выявляемых на поверхности дрожжей кДНК, или могут быть сконструированы, основываясь на известной трехмерной структуре взаимодействия.

В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 кон-

стантной области человеческого IgG1, могут находиться на аминокислотных остатках V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173. В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в Ск константной области человеческого IgG1, могут находиться на аминокислотных остатках E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

Сборка тяжелых цепей гетеродимерного антитела может быть выполнена путем экспрессии последовательностей тяжелой цепи двух различных антител в одной и той же клетке, что может привести к сборке гомодимеров каждой тяжелой цепи антитела, а также сборке гетеродимеров. Способствовать предпочтительной сборке гетеродимеров можно путем введения различных мутаций в домен СН3 каждой константной области антитела, как показано в US 13/494870, US 16/028850, US 11/533709, US 12/875015, US 13/289934, US 14/773418, US 12/811207, US 13/866756, US 14/647480 и US 14/830336. Например, мутации могут быть сделаны в домене СН3 на основе человеческого IgG1 и включать в себя отдельные пары аминокислотных замен в первом полипептиде и втором полипептиде, что позволяет этим двум цепям селективно гетеродимеризоваться друг с другом. Положения аминокислотных замен, показанные ниже, все пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Кабат.

В одном сценарии аминокислотная замена в первом полипептиде заменяет исходную аминокислоту более крупной аминокислотой, выбранной из аргинина (R), фенилаланина (F), тирозина (Y) или триптофана (W), и по меньшей мере одна аминокислотная замена во втором полипептиде заменяет исходную аминокислоту(ы) меньшей аминокислотой(ами), выбранной из аланина (A), серина (S), треонина (T) или валина (V), таким образом что более крупная аминокислотная замена (выпуклость) помещается на поверхности меньших аминокислотных замен (полость). Например, один полипептид может содержать замену T366W, а другой может содержать три замены, включая T366S, L368A и Y407V.

Одна или более мутаций могут быть включены в константную область по сравнению с константной областью человеческого IgG1, например, в Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и/или K439. Примеры замен включают, например, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных в табл. 6.

Таблица 6

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Набор 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Набор 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Набор 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Набор 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Набор 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Набор 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Набор 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Набор 9	L368D/K370S	S364K
Набор 10	L368E/K370S	S364K
Набор 11	K360E/Q362E	D401K
Набор 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Набор 13	K370S	S364K/E357Q
Набор 14	F405L	K409R
Набор 15	K409R	F405L

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующих наборов замен, представленных в табл. 7.

Таблица 7

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	K409W	D399V/F405T
Набор 2	Y349S	E357W
Набор 3	K360E	Q347R
Набор 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Набор 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

Альтернативно, аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора замен, представленного в табл. 8.

Таблица 8

	Первый полипептид	Второй полипептид
Набор 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Набор 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Набор 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Набор 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Набор 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Набор 6	E356K/D399K	K392D/K409D

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена в каждой полипептидной цепи может быть выбрана из табл. 9.

Таблица 9

Первый полипептид	Второй полипептид
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D и T411E

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора замен в табл. 10, где положение(я), указанное в столбце "Первый полипептид", заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой, и положение(я), указанное в столбце "Второй полипептид", заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой.

Таблица 10

Первый полипептид	Второй полипептид
K392, K370, K409 или K439	D399, E356 или E357

Альтернативно, по меньшей мере одна аминокислотная замена может быть выбрана из следующего набора в табл. 11, где положение(я), указанное в столбце "Первый полипептид", заменено любой известной положительно заряженной аминокислотой, и указанное положение(я) в столбце "Второй полипептид", заменено любой известной отрицательно заряженной аминокислотой.

Таблица 11

Первый полипептид	Второй полипептид
D399, E356 или E357	K409, K439, K370 или K392

Альтернативно аминокислотные замены могут быть выбраны из следующего набора в табл. 12.

Таблица 12

Первый полипептид	Второй полипептид
T350V, L351Y, F405A и Y407V	T350V, T366L, K392L и T394W

Альтернативно или дополнительно, структурная стабильность гетеромультимерного белка может быть увеличена введением S354C в первую или вторую полипептидную цепь и введением Y349C в противоположную полипептидную цепь, что создает искусственный дисульфидный мостик на границе двух полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в положении T366, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из T366, L368 и Y407.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной

K392 и K409, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из L351, E356, T366 и D399.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой Y349C, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой S354C.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами O347R, D399V и F405T, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами K360E и K409W.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366W, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T366S, T368A и Y407V, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменой T366W.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность одной полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, T366L, K392L и T394W, и причем аминокислотная последовательность другой полипептидной цепи константной области антитела отличается от аминокислотной последовательности константной области IgG1 заменами T350V, L351Y, F405A и Y407V.

Ниже перечислены примеры мутаций в константных областях, которые делают возможной гетеродимеризацию двух полипептидных цепей. Каждая тяжелая цепь A1, A2, B1 и B2 трастузумаба включает переменный домен тяжелой цепи трастузумаба (последовательность жирного шрифта) и константную область, полученную из IgG1 человека с мутациями в подчеркнутых аминокислотах. Тяжелая цепь A1 трастузумаба и тяжелая цепь B1 трастузумаба могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер. Тяжелая цепь A2 трастузумаба и тяжелая цепь B2 трастузумаба могут предпочтительно спариваться и образовывать гетеродимер.

Тяжелая цепь А трастузумаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA
MDYWGGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLYWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID
 NO:299).

Тяжелая цепь В трастузумаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA
MDYWGGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID
 NO:300).

Тяжелая цепь А1 трастузумаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA
MDYWGGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 VLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG* (SEQ ID
 NO:301).

Тяжелая цепь В1 трастузумаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARI
YPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA
MDYWGGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
 KTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG* (SEQ ID
 NO:302).

Описанные выше белки могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую цепь иммуноглобулина, содержащую scFv, шарнир и константную область антитела, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую цепь иммуноглобулина, например, содержащую другой scFv, шарнир и константную область антитела, или содержащую тяжелую цепь антитела, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; и третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела, может быть клонирована в третий вектор экспрессии. Первый, второй и, необязательно, третий векторы экспрессии можно стабильно трансфицировать совместно в клетки-хозяева для получения мультимерных белков, описанных в данном документе.

Для достижения наивысшего выхода мультиспецифического связывающего белка можно исследовать различные соотношения первого, второго и третьего вектора экспрессии, чтобы определить оптимальное соотношение для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с использованием способов, известных в данной области, таких как ограниченное разведение, ИФА, FACS, микроскопия или Clonexix.

Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для увеличения масштаба биореактора и поддержания экспрессии мультиспецифического связывающего белка. Мультиспецифические связывающие белки могут быть выделены и очищены с использованием методов, известных в данной области, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, хроматографию обмена с гидрофобным взаимодействием и хроматографию со смешанным режимом.

II. Терапевтическое применение

В изобретении предложены способы лечения рака с использованием описанного в данном документе мультиспецифического связывающего белка и/или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы можно использовать для лечения различных видов рака, включая солидную опухоль, лимфому и лейкоз. Желательно, чтобы тип рака, подлежащего лечению, соответствовал типу раковой клетки, с которой связывается белок. Например, лечение рака, экспрессирующего HER2, такого как рак молочной железы, экспрессирующий HER2, желательно лечить с использованием описанного в данном документе белка, который связывается с белком. В некоторых вариантах осуществления изобретение предлагает способы лечения различных видов рака, которые экспрессируют ВСМА, путем введения пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретение предлагает способы лечения различных видов рака, которые экспрессируют CD33, путем введения пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе.

Соответственно, один аспект изобретения предлагает способ лечения рака у пациента, где способ включает введение пациенту, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества белка, описанного в данном документе, для лечения рака. Дополнительные аспекты и варианты терапевтических способов описаны ниже.

Терапевтический способ можно охарактеризовать в зависимости от рака, который подлежит лечению. Например, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых других вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной груди, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак легких, рак печени, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак прямой кишки, рак почек, рак желудка, рак яичек или рак матки. В еще других вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных путей, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинический кератоз, острый лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидно-кистозную карциному, аденомы, аденосаркому, аденосквamousную карциному, рак анального канала, анальный рак, аноректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базально-клеточную карциному, рак желчных путей, рак кости, рак костного мозга, рак бронхов, карциному бронхов, нейроэндокринную опухоль, холангиокарциному, хондросаркому, папиллому/карциному сосудистого сплетения, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль энтодермального синуса, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, рак эндотелиальных клеток, эпидимальный рак, эпителиально-клеточный рак, саркому Юинга, рак глаза и орбиты, рак женских половых органов, очаговую узловую гиперплазию, рак желчного пузыря, рак антрального отдела желудка, рак дна желудка, гастриному, глиобластому, глюкагоному, рак сердца, гемангиобластому, гемангиоэндотелиому, гемангиомы, аденому печени, аденоматоз печени, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, межэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутриспеченочного желчного протока, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак суставов, саркому Капоши, рак таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, меланому типа злокачественного лентигио, лимфому, рак половых органов у мужчин, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, менингеальный рак, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак рта, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового тракта, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, неэпителиальный рак кожи, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркому, папиллярно-серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, легочную бластому, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, рак придаточных пазух носа, рак кожи, мелкоклеточную карциному, рак тонкой кишки, рак гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечно-полосатых мышц, субмезотелиальный рак, поверхностную распространяющуюся меланому, Т-клеточный лейкоз, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеоточника, рак мочеиспускательного канала, рак мочевого пузыря, рак мочевой системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному, ВИПому, рак вульвы, высококодифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

В некоторых других вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, представляет собой неходжкинскую лимфому, такую как В-клеточная лимфома или Т-клеточная лимфома. В некоторых вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой В-клеточную лимфому, такую как

диффузная В-крупноклеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, малая лимфоцитарная лимфома, лимфома из мантийных клеток, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, узловая В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки, лимфома Беркитта, лимфоплазмоцитарная лимфома, лейкоз ворсистых клеток или первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС). В некоторых других вариантах осуществления неходжкинская лимфома представляет собой Т-клеточную лимфому, такую как Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, периферическая Т-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома кожи, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная естественный киллер/Т-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, Т-клеточная лимфома типа подкожного панникулита, анапластическая крупноклеточная лимфома или периферическая Т-клеточная лимфома.

В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания представляют собой AML, миелодиспластические синдромы, хронический миеломоноцитарный лейкоз, миелоидный бластный криз хронического миелоидного лейкоза и ALL.

В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, можно охарактеризовать в соответствии с наличием конкретного антигена, экспрессируемого на поверхности раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может экспрессировать один или более из следующего перечня в дополнение к BCMA: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может экспрессировать один или более из следующего перечня в дополнение к CD33: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, TROP2, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

В некоторых вариантах осуществления раковая клетка может экспрессировать один или более из следующего перечня в дополнение к HER2: CD2, CD 19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 и PD1.

В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, может быть охарактеризован по презентованию конкретного пептида ТАА посредством МНС на поверхности раковой клетки. Неограничивающие примеры белков, которые могут быть преобразованы в TCR-нацеленные пептиды ТАА, включают антигены тканевой дифференциации (например, MART-1, gp100, CEA, CD19 и тирозиназу), антигены зародышевой линии опухоли (например, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A12, MAGE-C2, BAGE1, GAGE1, CTAG1, CTAG2, XAGE-1B и SSX2), нормальные белки, сверхэкспрессируемые раковыми клетками, (например, hTERT, EGFR, ERBB2, WT1, MUC1 и мезотелин), вирусные белки (например, HPV, EBV, и MCC) опухолеспецифичные мутировавшие антигены. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид ELAVL4, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 425, презентованный HLA-A*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид инсулина, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 426, презентованный HLA-A*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид hTERT, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 340, презентованный HLA-A*02:01:48. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид ERBB2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 341, презентованный HLA-A*02. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид WT1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 342, презентованный HLA-A*02. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид MAGE-A3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 343, презентованный HLA-A1. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид MART1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид BIRC5, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 346, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид PRAME, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 347, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид NY-ESO-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 348, презентованный HLA-A2. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка содержит пептид SSX2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 345, презентованный HLA-A2.

III. Комбинированная терапия

Другой аспект изобретения предлагает комбинированную терапию. Описанный в данном документе мультиспецифический связывающий белок можно использовать в комбинации с дополнительными терапевтическими агентами для лечения рака.

Примеры терапевтических агентов, которые можно использовать как часть комбинированной терапии при лечении рака, включают, например, облучение, митомин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронитол, метотрексат, доксорубин, карбоксон, пентоста-

тин, нитракрин, зиностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубин, фазрозол, фотемустин, тималфазин, собузоксан, надаплатин, цитарабин, бикалутамид, винорелбин, веснаринон, аминоклутетимид, амсакрин, проглумид, эллиптиния ацетат, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезин, флутамид, наркотический, бутоцин, кармофур, разоксан, сизофилан, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфат, эноцитабин, лизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпителиостанол, форместан, интерферон-альфа, интерферон-2 альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма, колониестимулирующий фактор 1, колониестимулирующий фактор 2, денилейкин дифтитокс, интерлейкин-2, фактор высвобождения лютеинизирующего гормона и варианты вышеупомянутых агентов, которые могут проявлять дифференциальное связывание с родственным ему рецептором и увеличивать или уменьшать период полужизни в сыворотке.

Дополнительным классом агентов, которые можно использовать как часть комбинированной терапии при лечении рака, являются ингибиторы иммунных контрольных точек. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают агенты, которые ингибируют один или более из (i) антигена 4, ассоциированного с цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTLA4), (ii) белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 и (vii) TIM3. Ингибитор CTLA4 ипилимумаб был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США для лечения меланомы.

Еще другие агенты, которые могут использоваться как часть комбинированной терапии при лечении рака, представляют собой агенты с моноклональными антителами, которые нацелены на мишени, не являющиеся контрольными точками (например, герцептин), и нецитотоксические агенты (например, ингибиторы тирозинкиназы).

Еще другие категории противораковых средств включают, например: (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора эксцизионной репарации оснований, ингибитора тирозинкиназы Vsg-Abl, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора циклинзависимой киназы, ингибитора ДНК-ПК, ингибитора как ДНК-ПК, так и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлор-дезоксиаденозина, ингибитора HDAC, ингибитора механизма передачи сигналов hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора как PARP1, так и DHODH, ингибитора протеасомы, ингибитора топоизомеразы-II, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора VEGFR и ингибитора WEE1; (ii) агонист OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25 или ICOS; и (iii) цитокин, выбранный из IL-12, IL-15, GM-CSF и G-CSF.

Белки по настоящему изобретению также можно использовать в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного поражения.

Количество мультиспецифического связывающего белка и дополнительного терапевтического агента и относительное время введения могут быть выбраны для достижения желаемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, при назначении комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические агенты в комбинации или фармацевтическая композиция или композиции, содержащие терапевтические агенты, могут вводиться в любом порядке, например, последовательно, параллельно, вместе, одновременно и тому подобное. Кроме того, например, мультиспецифический связывающий белок можно вводить в то время, когда дополнительный терапевтический агент(ы) оказывает свое профилактическое или терапевтическое действие, или наоборот.

IV. Фармацевтические композиции

Настоящее описание также предлагает фармацевтические композиции/составы, которые содержат терапевтически эффективное количество мультиспецифического связывающего белка, описанного в данном документе.

Композиция может быть составлена для использования в различных системах доставки лекарств. Один или более физиологически приемлемых эксципиентов или носителей также могут быть включены в композицию для правильного приготовления. Подходящие составы для использования в настоящем описании можно найти в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Для краткого обзора способов доставки лекарств см., например, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

Состав для внутривенной доставки лекарственного средства по настоящему изобретению может содержаться в пакете, ручке или шприце. В некоторых вариантах осуществления пакет может быть соединен с каналом, содержащим трубку и/или иглу. В некоторых вариантах осуществления состав может быть лиофилизированным составом или жидким составом. В некоторых вариантах осуществления состав может быть высушенным сублимацией (лиофилизирован) и содержаться примерно в 12-60 флаконах. В некоторых вариантах осуществления состав может быть лиофилизированным, и 45 мг лиофилизированного состава может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления от около 40 мг до около 100 мг лиофилизированной композиции может содержаться в одном флаконе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют для получе-

ния терапевтической дозы белка в форме лекарственного состава для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве от примерно 250 мг/флакон до примерно 1000 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве примерно 600 мг/флакон. В некоторых вариантах осуществления состав может быть жидким и храниться в количестве примерно 250 мг/флакон.

Белки по настоящему изобретению могут существовать в жидком водном фармацевтическом составе, включающем терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем состав.

Эти композиции можно стерилизовать обычными методами стерилизации или можно стерилизовать фильтрованием. Полученные водные растворы могут быть упакованы для использования как есть или лиофилизированы, при этом лиофилизированный препарат перед введением объединяют со стерильным водным носителем. pH препаратов обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно от 5 до 9 или от 6 до 8 и наиболее предпочтительно от 7 до 8, например от 7 до 7,5. Полученные композиции в твердой форме могут быть упакованы в виде многократных единиц разовых доз, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеуказанного агента или агентов. Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер в произвольном количестве.

В некоторых вариантах осуществления настоящее описание предлагает состав с увеличенным сроком хранения, включающий белок по настоящему описанию, в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом динатрийфосфата, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

В некоторых вариантах осуществления готовят водный состав, включающий белок по настоящему описанию в pH-буферном растворе. Буфер по настоящему изобретению может иметь pH в диапазоне от примерно 4 до примерно 8, например от примерно 4,5 до примерно 6,0, или от примерно 4,8 до примерно 5,5, или может иметь pH от примерно 5,0 до примерно 5,2. Промежуточные диапазоны в пределах указанных выше значений pH, также входят в объем данного изобретения. Например, подразумевается, что включены диапазоны значений, в которых комбинации любого из вышеперечисленных значений используются в качестве верхней и/или нижней границ. Примеры буферов, которые будут регулировать pH в этом диапазоне, включают ацетатные (например, ацетат натрия), сукцинатные (такие, как сукцинат натрия), глюконатные, гистидиновые, цитратные и другие буферы органических кислот.

В некоторых вариантах осуществления состав включает буферную систему, которая содержит цитрат и фосфат для поддержания pH в диапазоне от примерно 4 до примерно 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH может составлять от примерно 4,5 до примерно 6,0 или от примерно pH 4,8 до примерно 5,5 или в диапазоне pH от примерно 5,0 до примерно 5,2. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления буферная система включает примерно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), примерно 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), примерно 1,5 мг/мл дигидрата фосфата натрия (например, 1,53 мг/мл), примерно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (например, 0,86) и примерно 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления буферная система включает 1-1,5 мг/мл лимонной кислоты, 0,25-0,5 мг/мл цитрата натрия, 1,25-1,75 мг/мл дигидрата динатрийфосфата, 0,7-1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления pH композиции регулируют гидроксидом натрия.

В состав также может быть включен полиол, который действует как тонирующий агент и может стабилизировать антитело. Полиол добавляют в композицию в количестве, которое может варьироваться в зависимости от желаемой изотоничности композиции. В некоторых вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может быть изменено в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (например, маннита) по сравнению с дисахаридом (таким, как трегалоза). В некоторых вариантах осуществления полиол, который можно использовать в составе в качестве тонирующего агента, представляет собой маннит. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 5 до примерно 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от примерно 7,5 до примерно 15 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 10-14 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита может составлять примерно 12 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в композицию может быть включен полиол сорбит.

В состав также могут быть добавлены детергент или ПАВ. Типовые детергенты включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т.д.) или полочсамеры (например, полочсамер 188). Количество добавляемого детергента таково, что оно снижает агрегацию антитела в составе и/или сводит к минимуму образование частиц в составе и/или снижает адсорбцию. В некоторых вариантах осуществления состав может включать ПАВ, которое представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Твин 80. Твин 80 - это термин, используемый для описания полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата (см. Fiedler,

Lexikon der Hfisstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th edi., 1996). В некоторых вариантах осуществления состав может содержать от примерно 0,1 до примерно 10 мг/мл полисорбата 80 или от примерно 0,5 до примерно 5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в состав может быть добавлено около 0,1% полисорбата 80.

В вариантах осуществления белковый продукт по настоящему изобретению составлен в виде жидкого состава. Жидкий состав может быть представлен в концентрации 10 мг/мл либо во флаконе 50R типа I согласно Фармакопеи США/Европейской Фармакопеи, закрытом резиновой пробкой и запечатанном алюминиевой обжимной крышкой. Пробка может быть изготовлена из эластомера, соответствующего Фармакопеи США и Европейской Фармакопеи. В некоторых вариантах осуществления флаконы могут быть заполнены 61,2 мл раствора белкового продукта, чтобы обеспечить экстрагируемый объем 60 мл. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может быть разбавлен 0,9% физиологическим раствором.

В некоторых вариантах осуществления жидкий состав белков по настоящему описанию может быть приготовлен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром на стабилизирующем уровне. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть приготовлен в водном носителе. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем то, которое может привести к нежелательной или непригодной для внутривенного введения вязкости. В некоторых вариантах осуществления сахар может быть дисахаридом, например, сахарозой. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав может также включать один или более из буферного агента, ПАВ и консерванта.

В некоторых вариантах осуществления pH жидкого состава может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может быть соляной кислотой. В некоторых вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

Помимо агрегации, дезамидирование является распространенным вариантом образования продукта пептидов и белков, которое может происходить во время ферментации, сбора/очистки клеток от примесей, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного препарата и во время анализа образцов. Дезамидирование - это потеря NH_3 белком с образованием промежуточного сукцинимиды, который может подвергаться гидролизу. Промежуточный сукцинимид приводит к снижению массы исходного пептида на 17 Да. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 Да. Выделение промежуточного сукцинимиды затруднено из-за нестабильности в водных условиях. По существу, дезамидирование обычно обнаруживается по увеличению массы на 1 Да. Дезамидирование аспарагина приводит к образованию либо аспарагиновой, либо изоаспарагиновой кислоты. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую проницаемость растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию и третичную структуру полипептида. Аминокислотные остатки, прилегающие к Asn в пептидной цепи, влияют на скорость дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой чувствительности к дезамидированию.

В некоторых вариантах осуществления жидкий состав белков по настоящему описанию может храниться в условиях pH и влажности для предотвращения дезаминирования белкового продукта.

Представляющий интерес водный носитель в данном документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного использования (многократного приема).

Внутривенные (в/в) составы могут быть предпочтительным путем введения в определенных случаях, например, когда пациент находится в больнице после трансплантации и получает все лекарства внутривенным путем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия перед введением. В некоторых вариантах осуществления разбавленный лекарственный продукт для инъекций является изотоническим и подходит для введения путем внутривенной инфузии.

В некоторых вариантах осуществления компоненты соли или буфера могут быть добавлены в количестве от 10 до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и являются производными различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами или аминами, "образующими основания". В некоторых вариантах осуществления буфер может быть фосфатным буфером. В некоторых вариантах осуществления буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного использования (многократного приема).

Представляющий интерес водный носитель в данном документе является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

Белки по настоящему описанию могут существовать в лиофилизированном составе, включающем белки и лиопротектор. Лиопротектором может быть сахаром, например дисахаридами. В некоторых вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также включать один или более из буферного агента, ПАВ, наполнителя и/или консерванта.

Количество сахарозы или мальтозы, пригодное для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может находиться в массовом соотношении по меньшей мере 1:2 белка к сахарозе или мальтозе. В некоторых вариантах осуществления массовое соотношение белка и сахарозы или мальтозы может составлять от 1:2 до 1:5.

В некоторых вариантах осуществления pH состава перед лиофилизацией может быть установлен путем добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая кислота может быть соляной кислотой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемое основание может представлять собой гидроксид натрия.

Перед лиофилизацией pH раствора, содержащего белок по настоящему описанию, может быть отрегулирован от 6 до 8. В некоторых вариантах осуществления диапазон pH для лиофилизированного лекарственного продукта может составлять от 7 до 8.

В некоторых вариантах осуществления компоненты соли или буфера могут быть добавлены в количестве от 10 до 200 мМ. Соли и/или буферы являются фармацевтически приемлемыми и являются производными различных известных кислот (неорганических и органических) с металлами или аминами, "образующими основания". В некоторых вариантах осуществления буфер может быть фосфатным буфером. В некоторых вариантах осуществления буфер может быть глицинатным, карбонатным, цитратным буферами, и в этом случае ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоиона.

В некоторых вариантах осуществления может быть добавлен "наполнитель". "Наполнитель" представляет собой соединение, которое добавляет массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной массы (например, облегчает производство по существу однородной лиофилизированной массы, которая поддерживает открытопористую структуру). Иллюстративные наполнители включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие наполнители.

Консервант может быть необязательно добавлен в составы по настоящему изобретению для уменьшения действия бактерий. Добавление консерванта может, например, облегчить производство состава для многократного использования (многократного приема).

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт может быть составлен с водным носителем. Представляющий интерес водный носитель в данном документе является фармацевтически приемлемым (например, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применимым для приготовления жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-буферный солевой раствор), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт по настоящему описанию восстанавливается либо стерильной водой для инъекций, Фармакопея США (SWFI), либо 0,9% хлорида натрия для инъекций, Фармакопея США. Во время восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему описанию состоит из примерно 4,5 мл воды для инъекций и разбавляется 0,9% физиологическим раствором (раствор хлорида натрия).

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента.

Конкретная доза может быть одинаковой для каждого пациента, например 50-5000 мг белка. В качестве альтернативы доза для пациента может быть адаптирована к приблизительной массе тела или площади поверхности пациента. Другие факторы при определении подходящей дозировки могут включать заболевание или состояние, которое подлежит лечению или предотвращению, тяжесть заболевания, способ введения, а также возраст, пол и состояние здоровья пациента. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей для лечения дозировки, обычно выполняется специалистами в данной области техники, особенно в свете информации о дозировке и анализе, описанных в данном

документе. Дозировка также может быть определена с помощью общепринятых анализов для определения используемых доз в сочетании с соответствующими данными доза-реакция. Индивидуальная дозировка для пациента может быть скорректирована по мере наблюдения за развитием болезни. Можно измерить уровни целевого конструкта или комплекса в крови у пациента, чтобы увидеть, нужно ли корректировать дозировку для достижения или поддержания эффективной концентрации. Для определения того, какие целевые конструкции и/или комплексы, а также их дозировки, наиболее вероятно будут эффективны для данного человека, может использоваться фармакогеномика (Schmitz et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer et al., *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

Как правило, дозировки, основанные на массе тела, составляют от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг на кг массы тела, такие как от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 0,01 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 0,1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 1 мкг до примерно 10 мкг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 10 мкг до примерно 50 мкг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 50 мкг до примерно 100 мкг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 100 мкг до примерно 1 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 1 мг до примерно 10 мг/кг массы тела, от примерно 10 мг до примерно 100 мг/кг массы тела, от примерно 10 мг до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 50 мг до примерно 100 мг/кг массы тела.

Дозы можно вводить один или более раз в день, в неделю, в месяц или в год или даже один раз в 2-20 лет. Специалисты в данной области могут легко оценить частоту повторения для дозирования на основании измеренного времени удержания и концентраций целевого конструкта или комплекса в жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению может быть внутривенным, внутриартериальным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, внутривнутриплевральным, интратекальным, внутривнутриполостным, перфузией через катетер или прямой инъекцией внутрь очага поражения. Их можно вводить один или более раз в день, один или более раз в неделю, один или более раз в месяц и один или более раз в год.

Вышеприведенное описание описывает множество аспектов и вариантов осуществления изобретения. В данной патентной заявке конкретно рассматриваются все комбинации и изменения аспектов и вариантов осуществления.

Примеры

Теперь изобретение, в целом описываемое, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Пример 1. Очистка F3-TriNKET и F3'-TriNKET

Белки F3-TriNKET и F3'-TriNKET были очищены в соответствии со стадиями, которые используются для очистки терапевтических моноклональных антител. Вкратце, метод очистки включал очистку протеина А (достигается примерно 80-90% мономера) с последующей стадией элюирования соевым раствором Poros HS C1EX (достигается примерно 97-99% мономера). Для клинического производственного процесса может быть добавлена дополнительная стадия очистки с помощью Q сефарозы или Q Mustang (проточный режим) (для достижения около 99% мономера) для дальнейшего снижения всего белка клетки (WCP) и ДНК СНО.

Очищенный F3'-TriNKET имеет высокую термостабильность (DSC), аналогичную терапевтическим моноклональным антителам. А стабильность мутантного Fc, содержащего F3'-TriNKET, близка к Fc IgG1. См. табл. 13 ниже.

Таблица 13

Молекула	Tm ₁ (°C)	Tm ₂ (°C)	Tm ₃ (°C)
Герцептин	72,4	83,6	
F3'-TriNKET	73,2	79,0	86,7

Пример 2. F3'-TriNKET стабилен на протяжении по крайней мере 4-х недель

В ускоренном исследовании стабильности, проведенном при 37°C, было обнаружено, что F3'-TriNKET стабилен в течение 4 недель. См. фиг. 3А-3С.

Очищенный F3'-TriNKET был стабилен при низком уровне pH. 20 мг/мл очищенного белка инкубировали в течение 2 часов в глицине при pH 3,0. На фиг. 4 показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен при низком уровне pH.

Очищенный F3'-TriNKET был стабилен после 5 циклов замораживания-оттаивания. На фиг. 5А и фиг. 5В показано, что очищенный F3'-TriNKET был стабилен после 5 циклов замораживания-оттаивания, независимо от pH (на фиг. 5А показаны циклы замораживания-оттаивания в PBS, а на фиг. 5В показаны циклы замораживания-оттаивания в цитрате при pH 5,5).

Очищенный F3'-TriNKET был стабилен в исследованиях принудительной деградации. На фиг. 6 показаны столбчатые графики условий принудительной деградации, в которых F3'-TriNKET оставался стабильным.

Пример 3. Оценка связывания TriNKET с клетками, экспрессирующими раковые антигены человека

Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющий интерес раковый антиген, использовали для оценки связывания TriNKET с опухолевым антигеном. Клеточную линию AML человека Molm-13 использовали для оценки связывания F3'-TriNKET-CD33 с клетками, экспрессирующими CD33. Клеточную линию HER2+ Colo-201 использовали для оценки связывания F3'-TriNKET-HER2 с клетками, экспрессирующими HER2. F3'-TriNKET-HER2 и F3'-TriNKET-CD33 разводили и инкубировали с соответствующими клетками. Связывание F3'-TriNKET-HER2 и F3'-TriNKET-CD33 с HER2-экспрессирующими и CD33-экспрессирующими клетками, соответственно, детектировали с использованием конъюгированных с флуорофором вторичных антител к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, связывание MFI с HER2- и CD33-экспрессирующими клетками, соответственно, нормализовали по вторичным контрольным антителам для получения кратных значений по сравнению с контрольными значениями.

Пример 4. Первичный анализ цитотоксичности NK-клеток человека

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные PBMC промывали и готовили для выделения NK-клеток. NK-клетки выделяли с использованием метода отрицательной селекции с помощью магнитных шариков, чистота выделенных NK-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56+. Выделенные NK-клетки оставляли на ночь и использовали на следующий день для анализа цитотоксичности.

Анализ цитотоксичности DELFIA

Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры, клетки промывали PBS и ресуспендировали в питательной среде в концентрации 10⁶/мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). При мечении клеток-мишеней соблюдались инструкции производителя. После мечения клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в культуральной среде при 0,5-1,0×10⁵/мл. Для приготовления контрольных лунок аликвоту меченых клеток откладывали и клетки центрифугировали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех повторностях, чтобы не повредить осажденные клетки. 100 мкл меченых BATDA клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. В лунках предотвращали спонтанное высвобождение из клеток-мишеней, и лунки готовили для максимального лизиса клеток-мишеней добавлением 1% Тритона-Х. Моноклональные антитела или TriNKET к интересующей опухолевой мишени разводили в культуральной среде, в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенных mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные NK-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали в концентрации 10⁵-2,0×10⁶/мл в культуральной среде в зависимости от желаемого соотношения Е:Т. В каждую лунку планшета добавляли 50 мкл NK-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 2-3 ч перед разработкой анализа.

После культивирования в течение 2-3 ч планшет вынимали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 мин. Планшет считывали с помощью приборов Victor 3 или SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом: % специфического лизиса = ((эксперимен-

тальное высвобождение - спонтанное высвобождение) / (максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение) * 100%.

Анализ цитотоксичности проточной цитометрией

Линии раковых клеток человека, экспрессирующие ВСМА и трансдуцированные для стабильной экспрессии NucLight Green (Essen BioScience 4475) после отбора пурамицином, собирали из культуры, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 10^5 /мл в культуральной среде. 100 мкл клеток-мишеней добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. TriNKET к ВСМА разводили в культуральной среде и 50 мкл каждого добавляли в повторные лунки. Очищенные NK человека, оставленные на ночь, собирали из культуры, промывали и ресуспендировали в концентрации 4×10^5 /мл в культуральной среде. Для соотношения Е:Т 2:1 50 мкл NK-клеток добавляли во все лунки, за исключением контрольных, содержащих только мишени, в которые добавляли 100 мкл культуральной среды. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 30 ч.

После совместного культивирования клетки окрашивали, фиксировали и анализировали проточной цитометрией. Оставшиеся клетки-мишени были обнаружены со значительными сдвигами в канале ФИТЦ, при этом мертвые клетки исключены с помощью окрашивания в отношении жизнеспособности. Было выделено количество событий Green и рассчитан % уничтожения путем сравнения с контрольными образцами, содержащими только мишени. Были включены гранулы для счета, чтобы гарантировать сопоставимость записанных объемов.

Пример 5. F3'-TriNKET связываются с клетками, экспрессирующими опухолевые антигены

На фиг. 7 показано связывание F3'-TriNKET-HER2 или трастузумаба с клетками HER2+ Colo-201. F3'-TriNKET-HER2 связывал клетки Colo-201 с большей максимальной кратностью по сравнению с контролем, но имел слегка пониженное значение связывания EC₅₀.

На фиг. 8 показано связывание моноклонального антитела F3'-TriNKET-CD33 или CD33 с CD33, экспрессируемым на клетках Molm-13. F3'-TriNKET связывал клетки Molm-13 с аналогичной максимальной кратностью по сравнению с контролем и значением связывания EC₅₀ по сравнению с mAb к CD33.

Пример 6. F3'-TriNKET опосредуют цитотоксичность NK в отношении клеток-мишеней HER2+ и CD33+

На фиг. 9 и 10 показана цитотоксичность, опосредованная F3'-TriNKET-HER2, в отношении линии клеток 786-О с низким уровнем HER2 и линии клеток SkBr-3 с высоким уровнем HER2 соответственно. F3'-TriNKET-HER2 обеспечивал эффективные значения EC₅₀ для индукции NK-опосредованной цитотоксичности в отношении клеточных линий как с низким уровнем HER2, так и с высоким уровнем HER2. По сравнению с трастузумабом F3'-TriNKET-HER2 обеспечивал больший максимальный специфический лизис и более эффективные значения EC₅₀ для клеток, экспрессирующих HER2, как с низким уровнем, так и с высоким уровнем.

Фиг. 11 и 12 демонстрируют опосредованную F3'-TriNKET-CD33 цитотоксичность в отношении двух CD33-положительных линий клеток человека, EOL-1 и THP-1, соответственно. Моноклональное антитело CD33 было способно увеличивать лизис NK-клетками клеток-мишеней EOL-1 (фиг. 11), но было обнаружено, что оно неэффективно против линии клеток THP-1 с высоким уровнем FcR (фиг. 12). F3'-TriNKET-CD33 обеспечивал субнаномолярные значения EC₅₀ для индукции NK-опосредованной цитотоксичности в отношении клеток-мишеней THP-1 и EOL-1.

Пример 7. F4-TriNKET опосредуют цитотоксичность NK

В этом примере описывается эффективность опосредованного бивалентным TriNKET формата F4 усиления уничтожения NK-клетками раковых клеток-мишеней. В этом примере описывается связывание бивалентного TriNKET формата F4 с целевыми клетками. В этом примере описывается влияние бивалентного TriNKET формата F4 на стабилизацию и поддержание высокой экспрессии ВСМА на клеточной поверхности. В этом примере описывается, что avidность бивалентного TriNKET формата F4 к своей мишени улучшает аффинность, с которой TriNKET связывается с антигеном-мишенью, что фактически стабилизирует экспрессию и поддержание высоких уровней антигена-мишени на поверхности клетки.

Стабилизация поверхности ВСМА с помощью F4-TriNKET

ВСМА-положительные клетки миеломы KMS12-PE инкубировали с 10 мкг/мл F4-TriNKET или моноклональным антителом (EM-901), образцы делили на три части, аликвоты каждого образца помещали на лед на 20 мин, выдерживали при 37°C в течение 2 ч или 37°C в течение 24 ч. После периода инкубации клетки промывали и связанный F4-TriNKET детектировали с использованием вторичного антитела к IgG человека. После окрашивания клетки фиксировали и хранили при 4°C, все образцы анализировали в конце исследования.

Оценка связывания F4-TriNKET с клетками, экспрессирующими раковые антигены человека

Линии раковых клеток человека, экспрессирующие ВСМА, использовали для оценки связывания F4-TriNKET с опухолевым антигеном (например, A49-F4-TriNKET-ВСМА, NKG2D-связывающим доменом из клона ADI-27749 и ВСМА-связывающим доменом, полученным из EM-901). Клеточная линия множественной миеломы человека MM.1R, которая экспрессирует ВСМА на более высоком уровне, чем

клетки миеломы KMS12-PE, была использована для оценки связывания TriNKET с клетками, которые экспрессируют высокие уровни ВСМА. F4-TriNKET разводили и инкубировали с клетками MM.1R. Связывание F4-TriNKET детектировали с помощью конъюгированного с флуорофором вторичного антитела к IgG человека. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, связывание MF1 с клетками, экспрессирующими ВСМА, нормализовали по вторичным контрольным антителам для получения кратных значений по сравнению с контрольными значениями.

Первичный анализ цитотоксичности НК-клеток человека

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из лейкоцитов периферической крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные PBMC промывали и готовили для выделения НК-клеток. НК-клетки выделяли с использованием метода отрицательной селекции с помощью магнитных шариков, чистота выделенных НК-клеток обычно составляла > 90% CD3-CD56+. Выделенные НК-клетки оставляли на ночь и использовали на следующий день для анализа цитотоксичности.

Анализ цитотоксичности DELFIA:

Линии раковых клеток человека, экспрессирующие представляющую интерес мишень, собирали из культуры, клетки промывали PBS и ресуспендировали в питательной среде в концентрации 10^6 /мл для мечения реагентом BATDA (Perkin Elmer AD0116). При мечении клеток-мишеней соблюдались инструкции производителя. После мечения клетки промывали 3 раза PBS и ресуспендировали в культуральной среде при $0,5-1,0 \times 10^5$ /мл. Для приготовления контрольных лунок аликвоту меченых клеток откладывали, и клетки центрифугировали из среды. 100 мкл среды осторожно добавляли в лунки в трех повторностях, чтобы не повредить осажденные клетки. 100 мкл меченых BATDA клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. В лунках предотвращали спонтанное высвобождение из клеток-мишеней, и лунки готовили для максимального лизиса клеток-мишеней добавлением 1% Тритона-X. Моноклональные антитела или TriNKET к интересующей опухолевой мишени разводили в культуральной среде, в каждую лунку добавляли 50 мкл разведенных mAb или TriNKET. Покоящиеся и/или активированные НК-клетки собирали из культуры, клетки промывали и ресуспендировали в концентрации $10^5-2,0 \times 10^6$ /мл в культуральной среде в зависимости от желаемого соотношения Е:Т. В каждую лунку планшета добавляли 50 мкл НК-клеток, чтобы получить общий объем культуры 200 мкл. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 2-3 ч перед разработкой анализа. После культивирования в течение 2-3 ч планшет вынимали из инкубатора и клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин. 20 мкл супернатанта культуры переносили в чистый микропланшет, предоставленный производителем, и в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора европия комнатной температуры. Планшет защищали от света и инкубировали на шейкере для планшетов при 250 об/мин в течение 15 мин. Планшет считывали с помощью приборов Victor 3 или SpectraMax i3X. % специфического лизиса рассчитывали следующим образом: % специфического лизиса = ((экспериментальное высвобождение - спонтанное высвобождение)/(максимальное высвобождение - спонтанное высвобождение)) * 100%.

Цитотоксичность НК, опосредованная F4-TriNKET

Исследовали опосредованный F4-TriNKET лизис ВСМА-положительных миеломных клеток. На фиг. 19 показан опосредованный F4-TriNKET лизис ВСМА-положительных клеток миеломы KMS12-PE покоящимися эффекторными клетками НК человека. На фиг. 20 показан опосредованный F4-TriNKET лизис ВСМА-положительных клеток миеломы MM.1R покоящимися эффекторными клетками НК человека. Моноклональное антитело EM-901 использовали в качестве контроля в обоих экспериментах. На фиг. 19, клетки KMS12-PE (низкий уровень экспрессии ВСМА) использовали в качестве клеток-мишеней; а на фиг. В качестве клеток-мишеней использовали 20 MM.1R (высокий уровень экспрессии ВСМА). В отношении клеток с высокой и низкой экспрессией ВСМА, MM.1R и KMS12-PE, соответственно, F4-TriNKET имел субнаномолярные значения EC₅₀. По сравнению с моноклональным антителом ВСМА EM-901, F4-TriNKET обеспечивает более высокий максимальный специфический лизис и эффективность в отношении обеих клеточных линий.

На фиг. 21 показано связывание F4-TriNKET (A49-F4-TriNKET-ВСМА), DuoBody-TriNKET (A49-DB-TriNKET-ВСМА) или моноклонального антитела ВСМА (EM-901) с клетками миеломы MM. 1R. Все три белка были способны связываться с ВСМА, экспрессируемым на клетках MM.1R, дозозависимым образом. Авидные связующие были способны связываться со слегка пониженной максимальной кратностью по сравнению с моновалентными связующими, но avidность связывания обеспечивала улучшенное значение связывания EC₅₀.

F4-TriNKET стабилизируют поверхностный ВСМА

На фиг. 22 показано окрашивание поверхностного ВСМА моноклональным антителом F4-TriNKET или ВСМА (EM-901) после инкубации в течение указанного времени. И mAb к ВСМА (EM-901), и F4-TriNKET были способны быстро стабилизировать поверхностный ВСМА после инкубации. mAb к ВСМА (EM-901) и F4-TriNKET были способны поддерживать повышенную поверхностную экспрессию ВСМА в течение 24 ч.

Фиг. 23 показывает стабилизацию поверхностного ВСМА на клетках KMS12-PE после инкубации с

F4-TriNKET или моноклональным антителом к ВСМА (ЕМ-901). Начальная стабилизация ВСМА на клеточной поверхности произошла быстро после воздействия F4-TriNKET или mAb (ЕМ-901). Авидное связывание, обеспечиваемое F4-TriNKET и моноклональным антителом (ЕМ-901), поддерживало высокий уровень поверхностного ВСМА дольше, чем моновалентное связывание ВСМА, на что указывает падение экспрессии поверхностного ВСМА через 24 ч с DuoBody-TriNKET.

F4-TriNKET опосредуют значительную долгосрочную цитотоксичность

Анализ цитотоксичности проточной цитометрии: Линии раковых клеток человека, экспрессирующие ВСМА и трансдуцированные для стабильной экспрессии NucLight Green (Essen BioScience 4475) после отбора пуромицином, собирали из культуры, центрифугировали и ресуспендировали в концентрации 10^5 /мл в культуральной среде. 100 мкл клеток-мишеней добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. TriNKET к ВСМА разводили в культуральной среде и 50 мкл каждого добавляли в повторные лунки. Очищенные НК человека, оставленные на ночь, собирали из культуры, промывали и ресуспендировали в концентрации 4×10^5 /мл в культуральной среде. Для соотношения Е:Т 2:1 50 мкл НК-клеток добавляли во все лунки, за исключением контрольных, содержащих только мишени, в которые добавляли 100 мкл культуральной среды. Планшет инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 30 ч.

После совместного культивирования клетки окрашивали, фиксировали и анализировали проточной цитометрией. Оставшиеся клетки-мишени были обнаружены со значительными сдвигами в канале ФИТЦ, при этом мертвые клетки исключены с помощью окрашивания в отношении жизнеспособности. Было выделено количество событий Green и рассчитан % уничтожения путем сравнения с контрольными образцами, содержащими только мишени. Были включены гранулы для счета, чтобы гарантировать сопоставимость записанных объемов.

F4-TriNKET опосредуют значительную долгосрочную цитотоксичность

На фиг. 24 и 25 показан лизис НК-клетками человека ВСМА-положительных клеточных линий-мишеней с соотношением Е:Т на уровне 2:1 в присутствии F4- или DB-TriNKET через 30 ч. На фиг. 24 показано уничтожение клеток KMS12-PE (низкий уровень экспрессии ВСМА) по сравнению с уничтожением контроля без белка, тогда как на фиг. 25 в качестве клеток-мишеней использовали клетки MM.1S (более высокий уровень экспрессии ВСМА). По сравнению с моновалентным DuoBody-TriNKET, F4-TriNKET продемонстрировал повышенное уничтожение линий клеток с высоким и низким уровнем экспрессией ВСМА при всех тестируемых концентрациях.

Включение посредством ссылки

Полное описание каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено посредством ссылки для всех целей.

Эквиваленты

Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных характеристик. Таким образом, вышеприведенные варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие изобретение, описанное в данном документе. Следовательно, объем данного изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в предшествующем описании, и все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны быть включены в ее объем.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий:

- (a) одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который связывает ассоциированный с опухолью антиген, где scFv содержит варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи;
- (b) Fab, который связывает NKG2D; и
- (c) первый константный домен антитела и второй константный домен антитела, которые формируют связывающий гетеродимер CD16,

где scFv связан с N-концом первого константного домена антитела через шарнир, содержащий Ala-Ser последовательность, и Fab связан с N-концом второго константного домена антитела.

2. Белок по п.1, где ассоциированный с опухолью антиген выбран из группы, состоящей из ANO1, CAIX, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD20, CD22, CD25, CD30, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2, DLL3, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, SLAMF7, PSMA, мезотелина, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-альфа, PAPP-A, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, LILRA1, LILRA2, LILRA3, LILRA4, LILRA5, LILRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, P-кадгерина, плексина A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 и TYRP1.

3. Белок, содержащий:

(a) одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который связывает ассоциированный с опухолью антиген;

(b) Fab, который связывает NKG2D; и

(c) первый константный домен антитела и второй константный домен антитела, которые формируют связывающий гетеродимер CD16,

где scFv содержит константный домен тяжелой цепи и константный домен легкой цепи и связан с N-концом первого константного домена антитела через шарнир и Fab связан с N-концом второго константного домена антитела, и

где ассоциированный с опухолью антиген выбран из группы, состоящей из CCR4, CD123, CD25, DLL3, GD2, CXCR4, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, LILRA1, LILRA2, LILRA3, LILRA4, LILRA5 и LILRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, P-кадгерина, плексина-A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, EDNRB, OLR1 и Tyrp1.

4. Белок по любому из пп.1-3, где варибельный домен тяжелой цепи формирует дисульфидный мостик с варибельным доменом легкой цепи, необязательно между C44 варибельного домена тяжелой цепи и C100 варибельного домена легкой цепи.

5. Белок по любому из пп.1-4, где варибельный домен тяжелой цепи scFv связан с варибельным доменом легкой цепи через гибкий линкер, необязательно где гибкий линкер включает (G₄S)₄.

6. Белок по любому из пп.1-5, где варибельный домен тяжелой цепи scFv расположен на N-конце варибельного домена легкой цепи.

7. Белок по любому из пп.1-6, где первый константный домен антитела и/или второй константный домен антитела содержит шарнир и CH2 домен антитела IgG1 человека.

8. Белок по любому из пп.1-7, где первый константный домен антитела и/или второй константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность аминокислотам 234-332 антитела IgG1 человека.

9. Белок по п.8, где первый константный домен антитела и/или второй константный домен антитела содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность Fc домену IgG1 человека и отличается на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439.

10. Белок по п.9, где первый константный домен антитела и второй константный домен антитела содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность Fc домену IgG1 человека и отличаются на одно или более положений, выбранных из группы, состоящей из Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D и K439E.

11. Белок по любому из пп.1-10, где Fab, который связывает NKG2D, содержит варибельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 94, где VH содержит последовательность определяющей комплементарности области (CDR)1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 319, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 320; и варибельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 98, где VL содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 101.

12. Белок по любому из пп.1-10, где Fab, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 322, где VH содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 319, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96, и последовательность CDR3, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 324; и VL, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 98, где VL содержит последовательность CDR1, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 99, последовательность CDR2, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100, и последовательность CDR3, иден-

тичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109.

26. Белок по любому из пп.1-10, где Fab, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 110, и VL, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 111.

27. Белок по любому из пп.1-10, где Fab, который связывает NKG2D, содержит VH, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 112, и VL, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности SEQ ID NO: 113.

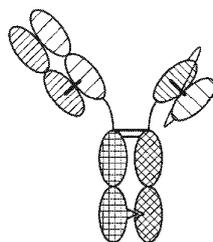
28. Состав, содержащий белок по любому из пп.1-27 и фармацевтически приемлемый носитель.

29. Способ усиления гибели опухолевых клеток, включающий воздействие белка по любому из пп.1-27 на опухолевые и натуральные клетки-киллеры.

30. Способ лечения рака, включающий введение пациенту белка по любому из пп.1-27 или состава по п.28.

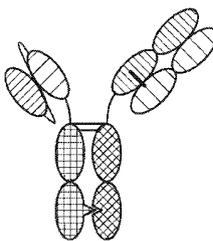
31. Способ по п.30, в котором рак выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, колоректального рака, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, рака пищевода, саркомы Юинга, фолликулярной лимфомы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, опухолей стромы желудочно-кишечного тракта, глиобластомы, рака головы и шеи, меланомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, почечно-клеточной карциномы, нейробластомы, немелкоклеточного рака легких, нейроэндокринных опухолей, рака яичников и рака поджелудочной железы, рака простаты, сарком, мелкоклеточного рака легких, Т-клеточной лимфомы, рака яичка, карциномы вилочковой железы, рака щитовидной железы, уротелиального рака, злокачественных заболеваний, инфильтрованных миелоидными клетками-супрессорами, злокачественных заболеваний с накоплением внеклеточного матрикса, злокачественных заболеваний с высокими уровнями реактивной стромы и злокачественных заболеваний с неоангиогенезом.

Нацеленный на NK-клетки FAB Нацеленный на опухоль scFv



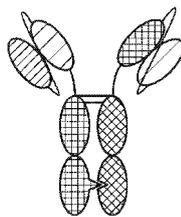
Фиг. 1А (F3'-формат)

Нацеленный на NK-клетки scFv Нацеленный на опухоль Fab



Фиг. 1В (F3-формат)

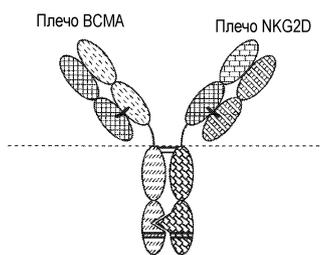
Нацеленный на NK-клетки scFv Нацеленный на опухоль scFv



Фиг. 1С

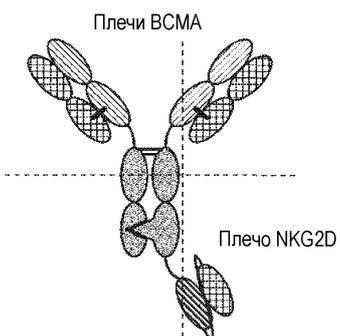
046081

Duobody (DB) TriNKET



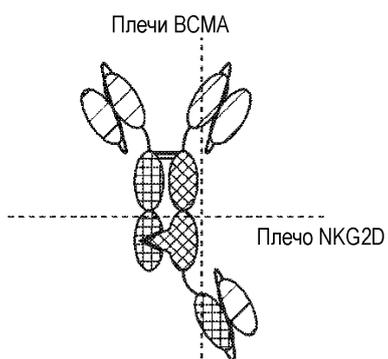
Фиг. 2А

F4 TriNKET



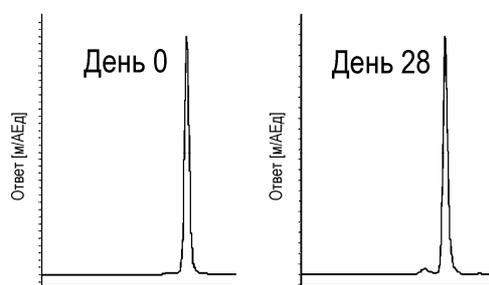
Фиг. 2В

F4 TriNKET



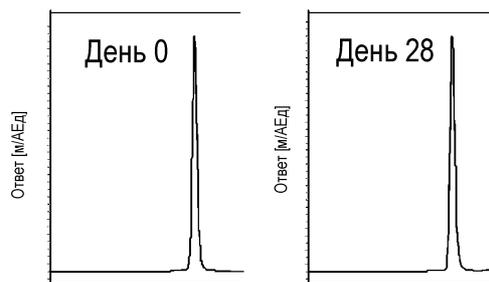
Фиг. 2С

ФСБ



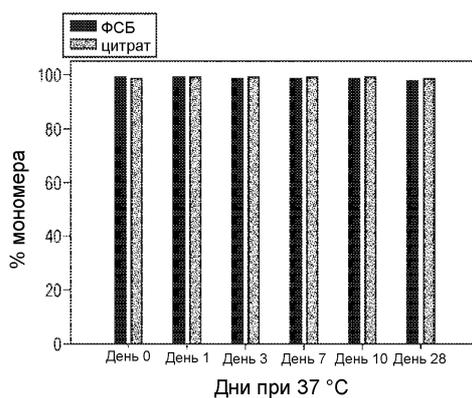
Фиг. 3А

Цитрат pH 5,5

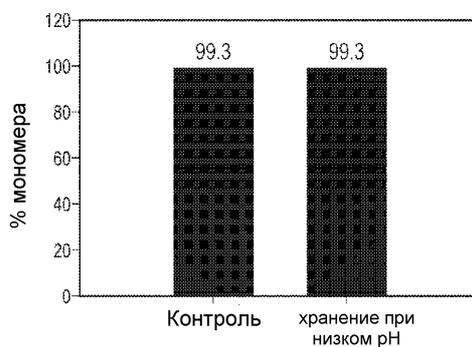


Концентрация белка 20 мг/мл

Фиг. 3В

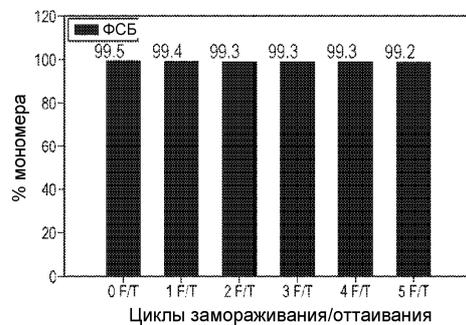


Фиг. 3С



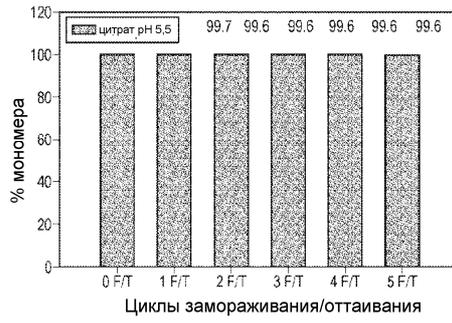
Фиг. 4

ФСБ

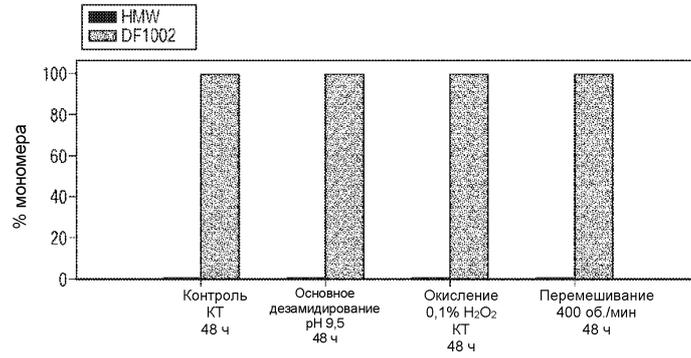


Фиг. 5А

Цитрат pH 5,5

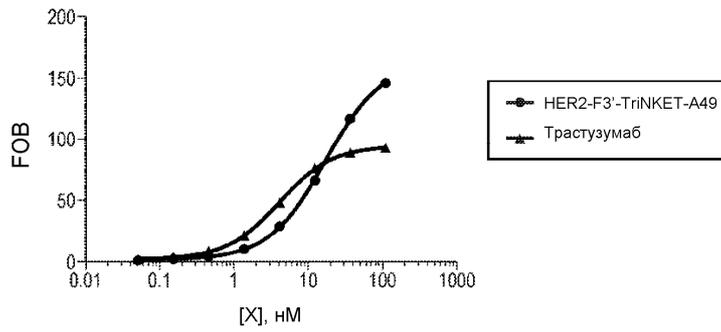


Фиг. 5B



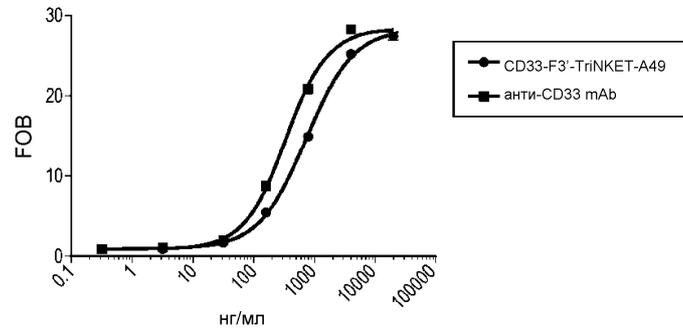
Фиг. 6

Солю-201

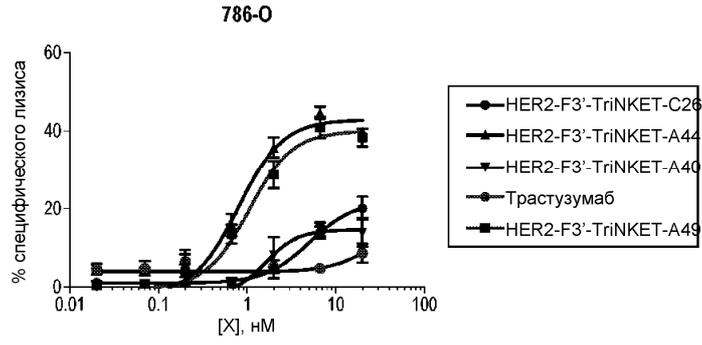


Фиг. 7

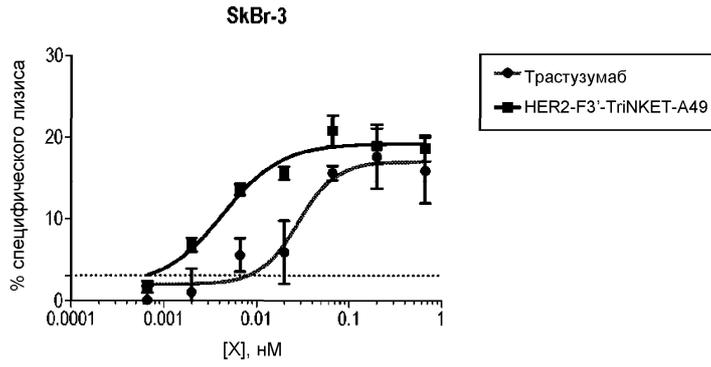
Molm-13



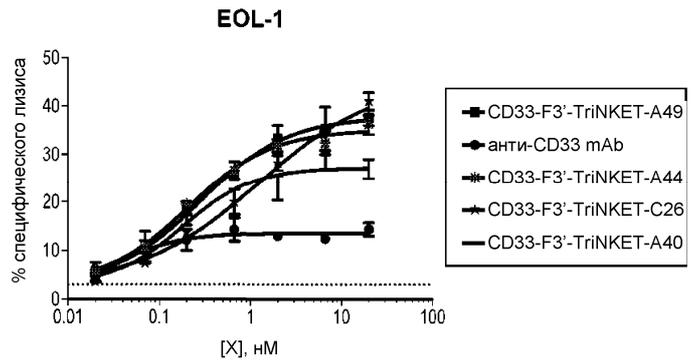
Фиг. 8



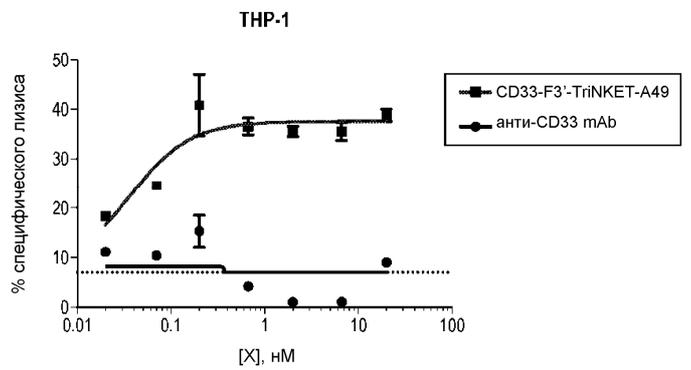
Фиг. 9



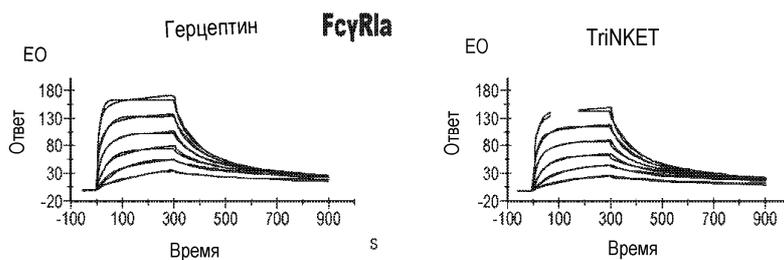
Фиг. 10



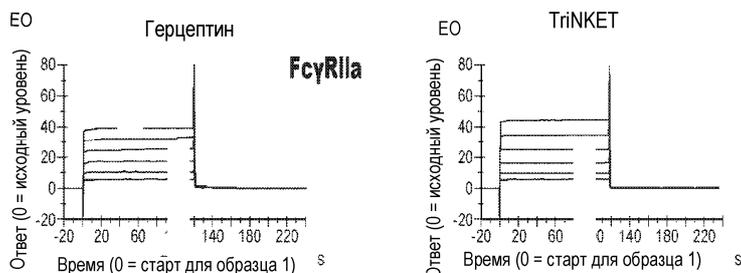
Фиг. 11



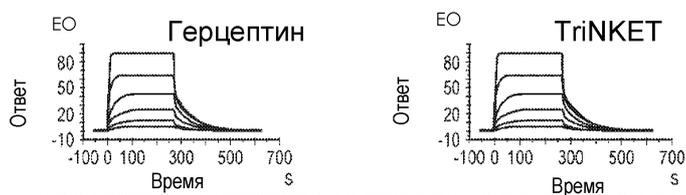
Фиг. 12



Фиг. 13А

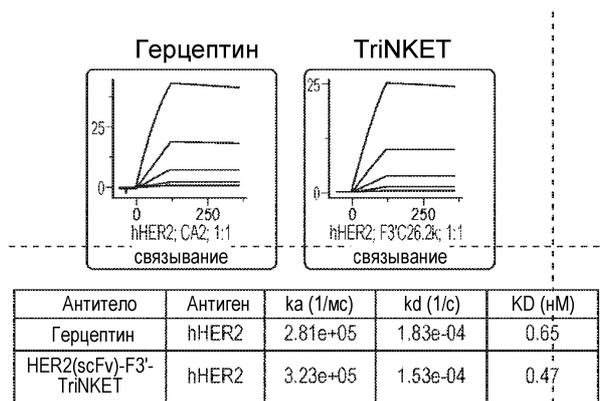


Фиг. 13В



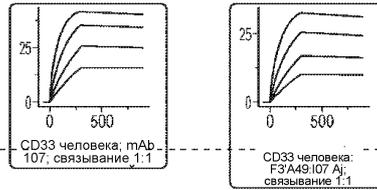
Связывание с рецептором FcγRIIa 158V человека				
Антиген	K_a (1/мс)	K_d (1/с)	K_D (М)	Rmax
Герцептин	1.69E+04	1.26E-02	7.46E-07	71.4
F3'-TriNKET-HER2	3.15E+04	2.20E-02	6.99E-007	72.9

Фиг. 13С



Фиг. 14А

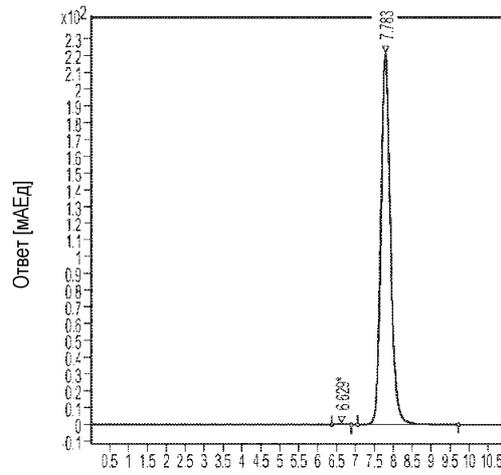
клон 107 mAb к CD33 TriNKET



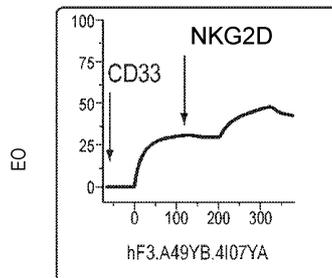
Антитело	Антиген	ka (1/мс)	kd (1/с)	KD (нМ)
Клон 107 к CD33 (scFv)-F3-TriNKET-A49	CD33 человека	1.61e+06	7.98e-05	0.05
Клон mAb к CD33 107	CD33 человека	2.07e+06	5.27e-05	0.025

Фиг. 14В

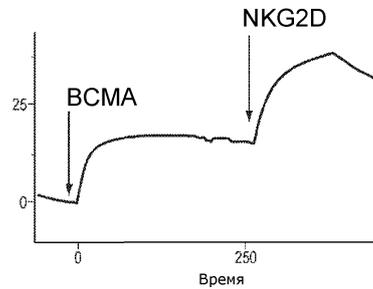
99% мономера после 2-й стадии очистки



Фиг. 15

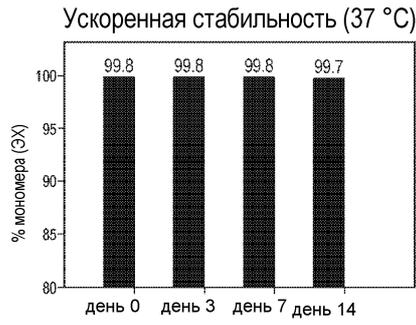


Фиг. 16

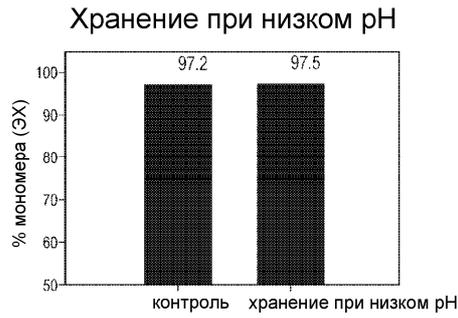


Фиг. 17

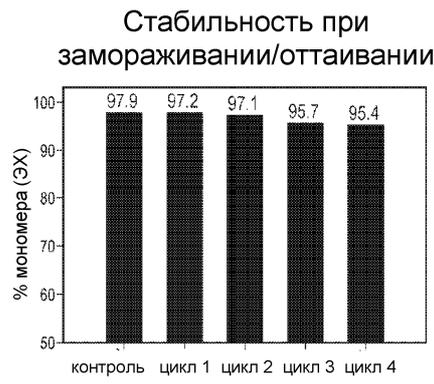
s



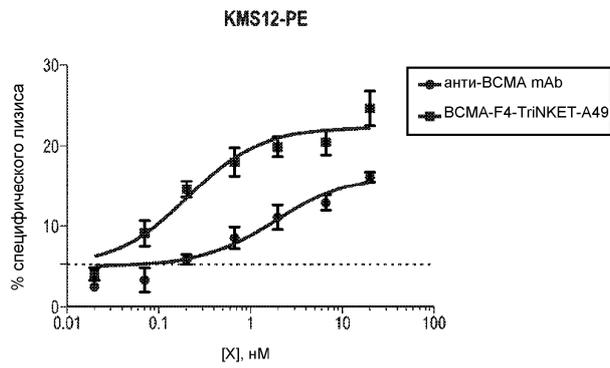
Фиг. 18А



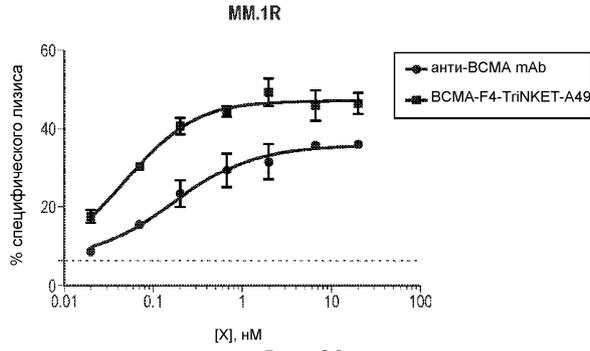
Фиг. 18В



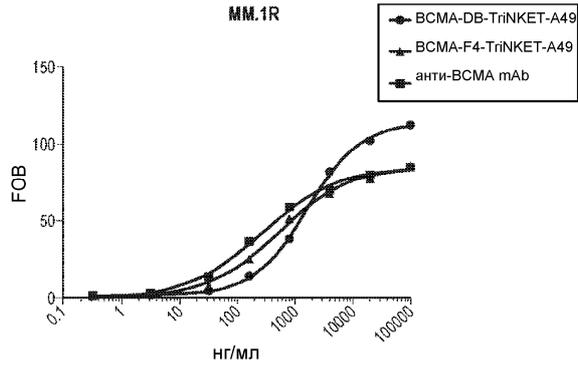
Фиг. 18С



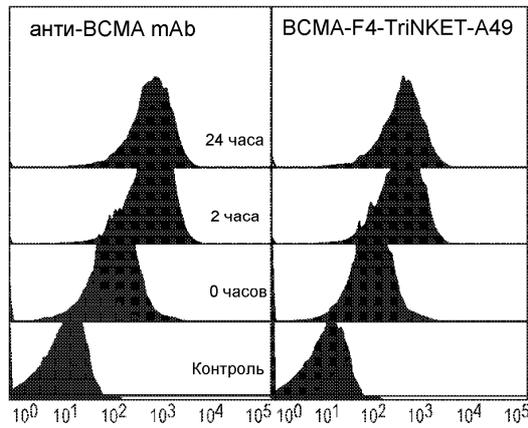
Фиг. 19



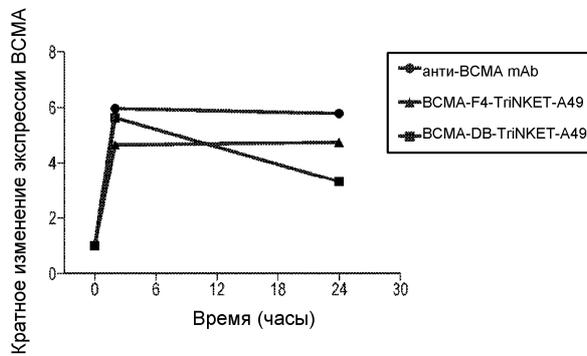
Фиг. 20



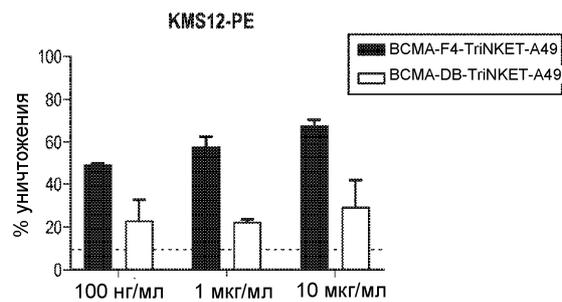
Фиг. 21



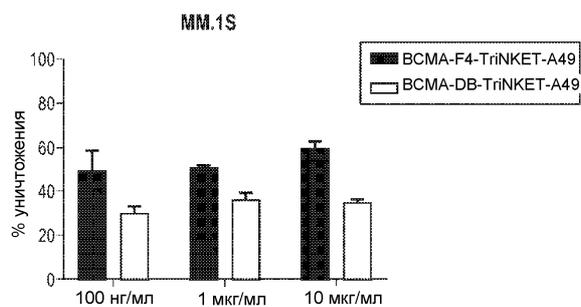
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

