

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490466 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.22

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 39/39 (2006.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.09.27

(54) АНТИТЕЛА, НАЦЕЛИВАЮЩИЕСЯ НА BAFF-R, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/250,092

(72) Изобретатель:

(32) 2021.09.29

Фишер Бенджамин, Хайн Пайе П.,  
Иванов Александр, Ли Синьби,  
Шнайдер Мэттью (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/077068

(87) WO 2023/056243 2023.04.06

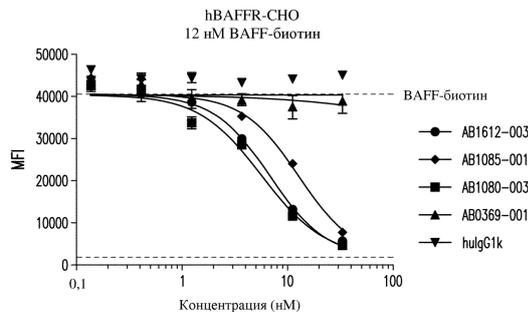
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ДРАГОНФЛАЙ ТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)

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

(57) Раскрыты белки с вариабельными доменами тяжелой цепи и легкой цепи антитела, которые могут быть спарены с образованием антигенсвязывающего участка, нацеливающегося на BAFF-R на поверхности клетки, фармацевтические композиции, содержащие такие белки, и терапевтические способы с применением таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака или аутоиммунного заболевания.



A1

202490466

202490466

A1

**АНТИТЕЛА, НАЦЕЛИВАЮЩИЕСЯ НА VAFF-R, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ****ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

**[0001]** Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/250092, поданной 29 сентября 2021 г., полное раскрытие которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

**[0002]** Данная заявка содержит машиночитаемый перечень последовательностей, который был подан в формате XML-файла через Патентный центр, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. XML-файл перечня последовательностей, поданный через Патентный центр, имеет название "14247-699-228\_seqlist.xml", был создан 16 сентября 2022 г., и его размер составляет 114456 байт.

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

**[0003]** В настоящем изобретении предусмотрены белки с переменными доменами тяжелой цепи и легкой цепи антитела, которые могут быть спарены с образованием антигенсвязывающего участка, нацеливающегося на VAFF-R на поверхности клетки, фармацевтические композиции, содержащие такие белки, и терапевтические способы с применением таких белков и фармацевтических композиций, в том числе для лечения рака или аутоиммунного заболевания.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0004]** Рак продолжает оставаться значительной проблемой для здоровья, несмотря на существенные исследовательские усилия и научные достижения, о которых сообщается в литературе по лечению данного заболевания. Некоторые из наиболее часто диагностируемых видов рака у взрослых включают рак предстательной железы, рак молочной железы и рак легкого. Гематологические злокачественные новообразования, хотя и менее частые, чем виды солидного рака, характеризуются низкими уровнями выживаемости. Существующие варианты лечения этих видов рака не эффективны для всех пациентов и/или могут характеризоваться значительными

нежелательными побочными эффектами. Другие типы рака также остаются сложной задачей для лечения с применением существующих терапевтических вариантов.

**[0005]** BAFF-R, также называемый рецептором BAFF, представителем 13С суперсемейства рецепторов TNF (TNFRSF13C), CD268 или BR3, представляет собой трансмембранный белок III типа суперсемейства рецепторов TNF. BAFF-R экспрессируется на поздней переходной (T2) стадии В-клеток и на всех зрелых В-клетках, его экспрессия снижается на В-клетках зародышевого центра, и он снова экспрессируется на клетках памяти и отсутствует на плазматических клетках (Davidson (2012) *Curr. Rheumatol. Rep.*, 14(4): 295-302). BAFF-R представляет собой рецептор фактора активации В-клеток (BAFF), фактора выживаемости В-клеток. BAFF может активировать три рецептора: BAFF-R, трансмембранный активатор и партнер CAML (TACI) и антиген созревания В-клеток (BCMA). Среди этих трех рецепторов BAFF-R является главным рецептором, участвующим в развитии фолликулярных В-клеток и В-клеток маргинальной зоны селезенки (Schiemann *et al.* (2001) *Science*, 293: 2111–14).

**[0006]** Сигнальная ось BAFF/BAFF-R может играть роль в гиперплазии В-клеток. Повышенная экспрессия BAFF-R, а также повышенные уровни BAFF в сыворотке крови наблюдались у пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL) (Shen *et al.* (2016) *Adv. Clin. Exp. Med.*, 25(5):837–44). Определенные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в BAFF-R ассоциированы с повышенным риском развития хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) (Jesek *et al.* (2016) *Tumour Biol.*, 37(10):13617–26). Ось BAFF/BAFF-R также участвует в аутоиммунных воспалительных заболеваниях (Mackay *et al.* (1999) *J. Exp. Med.*, 190:1697–1710). У некоторых пациентов с системной красной волчанкой (SLE) наблюдаются повышенные уровни BAFF в сыворотке крови (Cheema *et al.* (2001) *Arthritis Rheum.*, 44:1313–19), и BAFF-R постоянно заняты на В-клетках крови при SLE (Carter *et al.* (2005) *Arthritis Rheum.*, 52:3943–54). С учетом наблюдения, что аутореактивные В-клетки характеризуются большой зависимостью от BAFF для своего выживания по сравнению с защитными В-клетками (Lesley *et al.* (2004) *Immunity*, 20:441–53), было высказано предположение, что аномально высокие уровни BAFF могут способствовать патогенезу аутоиммунных заболеваний путем повышения выживаемости аутореактивных В-клеток.

**[0007]** Соответственно, в данной области сохраняется потребность в новых и применимых антителах, которые связывают BAFF-R, в частности антителах, которые связываются с BAFF-R и ингибируют его взаимодействие с BAFF.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0008]** В настоящем изобретении предусмотрены антигенсвязывающие участки, которые связывают BAFF-R. Белки и белковые конъюгаты, содержащие такие антигенсвязывающие участки, например, антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки (BiTE), и иммуноцитокينات, а также иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки), экспрессирующие белок, содержащий такой антигенсвязывающий участок (например, химерный антигенный рецептор (CAR)), применимы для лечения заболеваний, ассоциированных с BAFF-R, таких как рак и аутоиммунное заболевание.

**[0009]** Соответственно, в одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен антигенсвязывающий участок, который связывает или способен связывать BAFF-R, содержащий:

вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит последовательность определяющей комплементарность области 1 (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:50, последовательность определяющей комплементарность области 2 (CDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:51, и последовательность определяющей комплементарность области 3 (CDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:52; и

вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий последовательность CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4, последовательность CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:5, и последовательность CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:49.

**[0010]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен антигенсвязывающий участок, который связывает или способен связывать BAFF-R, где:

(a) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 46, 47 и 48 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 49 соответственно;

(b) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 1, 2 и 16, соответственно; и VL

содержит последовательности, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно;

(c) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 21, 2 и 22 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно;

(d) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 20, 23 и 26 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: : 4, 5 и 6 соответственно; или

(e) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 35, 36 и 37 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 49 соответственно.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 46, 47 и 48, соответственно; и VL, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 49 соответственно.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 1, 23 и 38, соответственно; и VL, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую замену G44C по сравнению с SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40. В некоторых вариантах осуществления

антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO:41. В некоторых вариантах осуществления VL содержит замену G100C по сравнению с SEQ ID NO:41. В некоторых вариантах осуществления VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:41. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:43.

**[0015]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен антигенсвязывающий участок, содержащий VH, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40, и VL, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:41, или VH, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42, и VL, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:43. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:41. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:43.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), Fab-фрагмента или моноклонального антитела.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv).

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, содержащего аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности под SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45. В некоторых вариантах

осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:44. В некоторых вариантах осуществления scFv состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:44.

**[0019]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен антигенсвязывающий участок, который конкурирует с антигенсвязывающим участком по любому из вышеуказанных вариантов осуществления за связывание с BAFF-R.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок связывает BAFF-R человека с константой диссоциации ( $K_D$ ), составляющей 5 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок ингибирует (например, блокирует) связывание BAFF-R с BAFF (например, на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания).

**[0022]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен белок, содержащий антигенсвязывающий участок по любому из вышеуказанных вариантов осуществления.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления белок дополнительно содержит константную область тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела представляет собой константную область тяжелой цепи человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела представляет собой константную область тяжелой цепи человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления каждая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности Fc-области человеческого IgG1 дикого типа.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа в одном или нескольких положениях, выбранных 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, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

**[0025]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или

несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа, выбранных 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, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, D401, F405, Y407, K409, T411, и K439, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

**[0027]** В некоторых вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены K360E и K409W по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены Q347R, D399V и F405T по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

**[0028]** В некоторых вариантах осуществления одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену Y349C по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену S354C по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

**[0029]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий белок по любому из вышеуказанных вариантов осуществления и компонент, представляющий собой лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления компонент, представляющий собой лекарственное средство, выбран из группы, состоящей из ауристатиона, N-ацетил-γ-калихеамицина, майтанзиноида, пирролобензодиазепина и SN-38.

**[0030]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен иммуноцитокин, содержащий антигенсвязывающий участок по любому из вышеуказанных вариантов осуществления и цитокин. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, TNF и IFNα.

**[0031]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, содержащий антигенсвязывающий участок по любому из вышеуказанных вариантов осуществления и антигенсвязывающий участок, который связывает CD3.

**[0032]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

- (a) антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению;
- (b) трансмембранный домен и
- (c) внутриклеточный сигнальный домен.

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбран из трансмембранных областей альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, BAFF-R, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, и CD154.

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен, предусматривающий функциональный сигнальный домен CD3-дзета, общую гамма-цепь FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен, предусматривающий функциональный сигнальный домен костимулирующего рецептора. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий рецептор выбран из группы, состоящей из OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, NKG2C, B7-H3, лиганда,

который связывается с CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS и 4-1BB (CD137), или любой их комбинации.

**[0035]** В другом аспекте в данном документе предусмотрена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая CAR по любому из вышеуказанных вариантов осуществления.

**[0036]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по вышеуказанному аспекту.

**[0037]** В другом аспекте в данном документе предусмотрена иммунная эффекторная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии по вышеуказанным аспектам.

**[0038]** В другом аспекте в данном документе предусмотрена иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR по любому из вышеуказанных аспектов. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку,  $\gamma\delta$ -Т-клетку или НКТ-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой НК-клетку.

**[0039]** В другом аспекте в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин, биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, или иммунную эффекторную клетку по любому из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0040]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ лечения рака, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества белка, конъюгата антитело-лекарственное средство, иммуноцитокина, биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки, иммунной эффекторной клетки или фармацевтической композиции по любому из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-NHL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому (FL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), первичную медиастинальную В-клеточную лимфому и острый

лимфоцитарный лейкоз (ALL). В некоторых вариантах осуществления рак характеризуется экспрессией BAFF-R.

**[0041]** В другом аспекте в данном документе предусмотрен способ лечения аутоиммунного воспалительного заболевания, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества белка, конъюгата антитело-лекарственное средство, иммуноцитокина, биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки, иммунной эффекторной клетки или фармацевтической композиции по любому из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, по любому из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления представляет собой очищенный антигенсвязывающий участок, белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки.

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, по любому из вышеуказанных аспектов или вариантов осуществления очищены с помощью способа, выбранного из группы, состоящей из центрифугирования, глубинной фильтрации, лизиса клеток, гомогенизации, замораживания-оттаивания, аффинной очистки, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, ионообменной хроматографии с гидрофобным взаимодействием и хроматографии со смешанным режимом.

**[0044]** Эти и другие аспекты и преимущества настоящего изобретения проиллюстрированы следующими фигурами, подробным описанием и формулой изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0045]** Настоящее изобретение можно более полно понять со ссылкой на следующие графические материалы.

**[0046]** На **фиг. 1** представлен график, показывающий результаты флуоресценции в анализе связывания, показывающем блокирование связывания BAFF-биотина с BAFF-R человека, экспрессируемым на клетках СНО, указанными антителами.

[0047] На **фиг. 2** представлен график, показывающий результаты флуоресценции в анализе блокирования связывания BAFF-биотина с BAFF-R, экспрессируемым на клетках CHO, указанными антителами.

[0048] На **фиг. 3A-3D** представлены графики результатов флуоресценции в анализах связывания на клетках CHO, показывающие связывание указанных антител с BAFF-R (**фиг. 3A, фиг. 3B**), или в анализе блокирования связывания BAFF-биотина с BAFF-R указанными антителами (**фиг. 3C, фиг. 3D**).

[0049] На **фиг. 4A-4E** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание AB0369scFv, экспрессируемого на дрожжах, с контролем без антигена (**фиг. 4A**), h-BAFF-R-hFc (**фиг. 4B**), нерелевантным белком-hFc (**фиг. 4C**), hBAFF-R-GST (**фиг. 4D**) или нерелевантным белком-GST (**фиг. 4E**). По вертикальной оси указана экспрессия scFv, как измерено при выявлении эпитопной метки Flag; по горизонтальной оси указано связывание биотинилированного контроля конструкций BAFF-R с scFv, как измерено при выявлении стрептавидина-PE.

[0050] На **фиг. 5A и 5B** представлены графики, показывающие связывание AB0369 или указанных контролей с BAFF-R человека (**фиг. 5A**) или яванского макака (**фиг. 5B**).

[0051] На **фиг. 6A и 6B** подробно описан анализ полиспецифичности мультиспецифических связывающих белков с участком связывания BAFF-R, полученным из AB0369. На **фиг. 6A** представлена схема анализа. На **фиг. 6B** показаны графики для AB0369 (левые панели), трастузумаба в качестве отрицательного контроля (средние панели) или иксекизумаба в качестве положительного контроля (правые панели) в отсутствие (верхние панели) или в присутствии (нижние панели) реагента для определения полиспецифичности (PSR).

[0052] На **фиг. 7** представлен график, показывающий анализ цитотоксичности KHYG-1-CD16aV в отношении клеток Ramos, индуцированной мультиспецифическим связывающим белком с участком связывания BAFF-R, полученным из AB0369.

[0053] На **фиг. 8** представлен график, показывающий результаты флуоресценции в анализе связывания, показывающем блокировку связывания BAFF-биотина с BAFF-R человека, экспрессируемым на клетках CHO, с помощью AB0369 или указанного реагента.

[0054] На **фиг. 9A-9D** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание hBAFF-R-hFc-His с исходным AB0369scFv или клонами,

выбранными из библиотеки, полученной путем созревания аффинности, экспрессируемыми на дрожжах после последовательных циклов отбора. На **фиг. 9А** показано связывание с исходным АВ0369scFv; на **фиг. 9В** показано связывание с образцом из первого цикла отбора клонов; на **фиг. 9С** показано связывание с образцом из второго цикла отбора клонов; на **фиг. 9D** показано связывание с продуктом, полученным во втором цикле отбора клонов.

**[0055]** На **фиг. 10А-10Е** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание hBAFF-R-hFc-His с АВ0369 и клонами scFv с созревшей аффинностью, экспрессируемыми на дрожжах. На **фиг. 10А** показано связывание с исходным АВ0369; на **фиг. 10В** показано связывание с АВ0605; на **фиг. 10С** показано связывание с АВ0622; на **фиг. 10D** показано связывание с АВ0622; и на **фиг. 10Е** показано связывание с scFv на основе ианалумаба.

**[0056]** На **фиг. 11А-11С** представлены графики, демонстрирующие связывание BAFF-R и цитотоксичность мультиспецифических связывающих белков, разработанных за счет созревания аффинности АВ0369. На **фиг. 11А** представлен график, показывающий связывание мультиспецифических связывающих белков с участками связывания BAFF-R, полученными из указанных клонов, с BAFF-R человека, экспрессируемым на клетках CHO. На **фиг. 11В** представлен график, показывающий анализ цитотоксичности КНУГ-1-CD16aV в отношении клеток Ramos, индуцированной мультиспецифическими связывающими белками с участками связывания BAFF-R, полученными из указанных клонов. На **фиг. 11С** представлен график, показывающий анализ цитотоксичности КНУГ-1-CD16aV в отношении клеток Ramos, индуцированной мультиспецифическими связывающими белками с участками связывания BAFF-R, полученными из АВ0622.

**[0057]** На **фиг. 12А** и **12В** подробно описан анализ полиспецифичности мультиспецифических связывающих белков с участками связывания BAFF-R, полученными из АВ00605 и АВ0606. На **фиг. 12А** представлена схема анализа. На **фиг. 12В** показаны графики для АВ0605 (левые панели) или АВ0606 (правые панели) в отсутствие (верхние панели) или в присутствии (нижние панели) реагента для определения полиспецифичности (PSR).

**[0058]** На **фиг. 13А-13С** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание hBAFF-R-hFc-His с исходным АВ0369scFv или клонами, выбранными из библиотеки, полученной путем созревания аффинности, и

экспрессируемыми на дрожжах после последовательных циклов отбора. На **фиг. 13А** показано связывание с исходным АВ0369scFv; на **фиг. 13В** показано связывание с образцом из первого цикла отбора клонов; на **фиг. 13С** показано связывание с образцом из второго цикла отбора клонов.

**[0059]** На **фиг. 14А-14Е** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание hBAFF-R-hFc-His с АВ0369 и клонами scFv с созревшей аффинностью, экспрессируемыми на дрожжах. На **фиг. 14А** показано связывание с исходным АВ0369; на **фиг. 14В** показано связывание с АВ0679; на **фиг. 14С** показано связывание с АВ0681; на **фиг. 14D** показано связывание с АВ0682; и на **фиг. 14Е** показано связывание с scFv на основе ианалумаба.

**[0060]** На **фиг. 15А-15С** представлены графики, демонстрирующие связывание BAFF-R с мультиспецифическими связывающими белками, разработанными за счет созревания аффинности АВ0369. На **фиг. 15А** представлен график, показывающий связывание мультиспецифических связывающих белков с участками связывания BAFF-R, полученными из указанных клонов, с BAFF-R человека, экспрессируемым на клетках CHO. На **фиг. 15В** представлен график, показывающий связывание мультиспецифических связывающих белков с участками связывания BAFF-R, полученными из указанных клонов, с BAFF-R яванского макака, экспрессируемым на клетках CHO. На **фиг. 15С** представлен график, показывающий результаты флуоресценции в анализе связывания, показывающем блокировку связывания BAFF-биотина с BAFF-R, экспрессируемым на клетках CHO, с помощью указанных антител.

**[0061]** На **фиг. 16** представлен график, показывающий анализ цитотоксичности KHYG-1-CD16aV в отношении клеток VJAB, индуцированной мультиспецифическими связывающими белками с участками связывания BAFF-R, полученными из АВ0679, АВ0568, или экспериментальное F3' в качестве положительного контроля.

**[0062]** На **фиг. 17А-17D** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание hBAFF-R-hFc-His с клонами исходного АВ0369scFv, выбранными из библиотеки, полученной путем созревания аффинности, экспрессируемыми на дрожжах после последовательных циклов отбора. На **фиг. 17А** показано связывание с исходным АВ0369scFv; на **фиг. 17В** показано связывание с образцом из первого цикла отбора клонов; на **фиг. 17С** показано связывание с образцом из второго цикла отбора клонов; и на **фиг. 17D** показано связывание с образцом из третьего цикла отбора клонов.

[0063] На **фиг. 18А-18F** представлены графики проточной цитометрии, показывающие связывание hBAFF-R-hFc-His с АВ0369 и клонами scFv с созревшей аффинностью, экспрессируемыми на дрожжах. На **фиг. 18А** показано связывание с исходным АВ0369; на **фиг. 18В** показано связывание с АВ0682; на **фиг. 18С** показано связывание с АВ0898; на **фиг. 18D** показано связывание с АВ0899; на **фиг. 18Е** показано связывание с АВ0900; и на **фиг. 18F** показано связывание с scFv на основе ианалумаба.

[0064] На **фиг. 19** представлен график, показывающий анализ цитотоксичности КНУG-1-CD16aV в отношении клеток ВJAB, индуцированной мультиспецифическими связывающими белками с участками связывания BAFF-R, полученными из АВ0898, АВ0899 или АВ0900.

[0065] На **фиг. 20** показаны графики профилей дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для АВ0898 (верхняя панель), АВ0899 (центральная панель) и АВ0900 (нижняя панель).

[0066] На **фиг. 21** показаны графики проточной цитометрии связывания клонов scFv, экспрессируемых на дрожжах, с биотинилированным hBAFFR-Fc до (слева) и после (справа) испытания путем инкубации с 1 мМ небитинилированного hBAFFR-Fc.

[0067] На **фиг. 22** показаны графики проточной цитометрии связывания клонов scFv, экспрессируемых на дрожжах, с биотинилированным hBAFFR-Fc до (вверху) и после (внизу) испытания путем инкубации с 1 мМ небитинилированного hBAFFR-Fc. Тестируют такие клоны (слева направо): АВ1080, АВ1081, АВ1084, АВ1085 и scFv на основе ианалумаба.

[0068] На **фиг. 23А** и **23В** представлены графики, показывающие связывание указанных клонов антител с BAFF-R человека (**фиг. 23А**) или яванского макака (**фиг. 23В**).

[0069] На **фиг. 24А** и **24В** подробно описан анализ полиспецифичности мультиспецифических связывающих белков с участком связывания BAFF-R, полученным из АВ1080 или АВ1081. На **фиг. 24А** представлена схема анализа. На **фиг. 24В** показаны графики для АВ1080 (левые панели), АВ1081 (средние левые панели), трастуумаба в качестве отрицательного контроля (средние правые панели) или иксекиумаба в качестве положительного контроля (правые панели) в отсутствие (верхние панели) или в присутствии (нижние панели) реагента для определения полиспецифичности (PSR).

[0070] На **фиг. 25А** и **25В** показаны графики анализа цитотоксичности КНУГ-1-CD16aV в отношении клеток ВJAB, индуцированной мультиспецифическими связывающими белками с участками связывания BAFF-R, полученными из АВ1080 (**фиг. 25А**) или АВ1085 (**фиг. 25В**), по сравнению с экспериментальным антителом в качестве положительного контроля.

[0071] На **фиг. 26** представлен график, показывающий результаты флуоресценции в анализе связывания, показывающем блокировку связывания BAFF-биотина с BAFF-R человека, экспрессируемым на клетках СНО, указанными клонами антителам.

[0072] На **фиг. 27** показаны графики анализа с использованием нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF) мультиспецифических связывающих белков с участками связывания BAFF-R, полученными из АВ1080 (левая панель), АВ1081 (левая центральная панель), АВ1084 (правая центральная панель) и АВ1085 (правая панель).

[0073] На **фиг. 28** показан график анализа на основе хроматографии с гидрофобным взаимодействием (НВС) мультиспецифических связывающих белков с участками связывания BAFF-R, полученными из указанных антител.

[0074] На **фиг. 29** показан график НВС-анализа АВ1612 по сравнению с указанными сравнительными биологическими препаратами.

[0075] На **фиг. 30А** и **30В** представлены графики, показывающие связывание указанных клонов антител с BAFF-R человека (**фиг. 30А**) или яванского макака (**фиг. 30В**).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0076] В настоящем изобретении предусмотрены антигенсвязывающие участки, которые связывают BAFF-R человека. Белки и белковые конъюгаты, содержащие такие антигенсвязывающие участки, например, антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки (BiTE), и иммуноцитокينات, а также иммунные эффекторные клетки (например, Т-клетки), экспрессирующие белок, содержащий такой антигенсвязывающий участок (например, химерный антигенный рецептор (CAR)), применимы для лечения заболеваний, ассоциированных с BAFF-R, таких как рак и аутоиммунное заболевание. Различные аспекты настоящего изобретения изложены в разделах ниже; однако аспекты

настоящего изобретения, описанные в одном конкретном разделе, не должны ограничиваться каким-либо конкретным разделом.

[0077] Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже определен ряд терминов и фраз.

[0078] Используемые в данном документе термины в единственном числе означают "один или несколько" и включают их формы во множественном числе, если контекст не является неуместным.

[0079] Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий участок" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена или способна его обеспечивать. В человеческих антителах антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых переменных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три существенно различающихся отрезка в пределах V-областей тяжелой и легкой цепей называются "гиперпеременными областями", которые расположены между более консервативными фланкирующими отрезками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые в естественных условиях встречаются между гиперпеременными областями в иммуноглобулинах, а также прилегают к ним. В молекуле человеческого антитела три гиперпеременных области легкой цепи и три гиперпеременных области тяжелой цепи в трехмерном пространстве расположены относительно друг друга так, что образуют антигенсвязывающую поверхность. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, а три гиперпеременные области каждой из тяжелой и легкой цепей называются "определяющими комплементарность областями" или "CDR". У определенных животных, таких как верблюды и хрящевые рыбы, антигенсвязывающий участок образован одной цепью антитела, обеспечивающей образование "однодоменного антитела". Антигенсвязывающие участки могут присутствовать в интактном антителе, в антигенсвязывающем фрагменте антитела, который сохраняет антигенсвязывающую поверхность, или в рекомбинантном полипептиде, таком как scFv, где используется пептидный линкер для соединения переменного домена тяжелой цепи с переменным доменом легкой цепи в один полипептид. Все аминокислотные положения в переменных областях тяжелой и легкой цепей,

раскрытых в данном документе, пронумерованы в соответствии с нумерацией согласно Kabat.

**[0080]** CDR антигенсвязывающего участка можно определить посредством способов, описанных в Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977), и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest.* (1991), Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996). CDR, определенные в соответствии с данными определениями, как правило, содержат перекрывающиеся аминокислотные остатки или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. В определенных вариантах осуществления термин “CDR” представляет собой CDR, определенный в MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996) и Martin A., *Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*, в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dubel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В определенных вариантах осуществления термин “CDR” представляет собой CDR, определенный в Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest.* (1991). В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи антитела определяют с применением различных методик. Например, в определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи определяют согласно MacCallum (выше), а CDR легкой цепи определяют согласно Kabat (выше). CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, а CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

**[0081]** Используемые в данном документе термины “субъект” и “пациент” относятся к организму, подлежащему лечению посредством способов и композиций, описанных в данном документе. Такие организмы предпочтительно включают без ограничения млекопитающих (например, представителей мышинных, обезьянообразных, лошадиных, бычьих, свинообразных, псовых, кошачьих и т. п.) и более предпочтительно включают людей.

**[0082]** Используемый в данном документе термин “эффективное количество” относится к количеству соединения (например, соединения по настоящему изобретению), достаточному для достижения полезных или требуемых результатов. Эффективное количество можно вводить за одну или несколько процедур введения, процедур применения или доз, и при этом не предусматривается, что оно ограничено конкретным составом или путем введения. Используемый в данном документе термин “лечение” включает любой эффект, например, ослабление, уменьшение,

модулирование, снижение выраженности или устранение, который приводит к улучшению в отношении течения состояния, заболевания, нарушения и т. п. или снижению выраженности его симптома.

**[0083]** Используемый в данном документе термин “фармацевтическая композиция” относится к комбинации активного средства с носителем, являющимся инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

**[0084]** Используемый в данном документе термин “фармацевтически приемлемый носитель” относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как забуференный фосфатом солевой раствор, вода, эмульсии (например, такие как эмульсии по типу масло/вода или по типу вода/масло) и различные типы смачивающих средств. Композиции также могут содержать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и вспомогательных средств см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

**[0085]** Используемый в данном документе термин “фармацевтически приемлемая соль” относится к любой фармацевтически приемлемой соли (например, кислоты или основания) соединения по настоящему изобретению, которая при введении субъекту способна обеспечивать образование соединения по настоящему изобретению или его активного метаболита или остатка. Как известно специалистам в данной области, “соли” соединений по настоящему изобретению могут быть получены из неорганических или органических кислот и оснований. Иллюстративные кислоты включают без ограничения хлористоводородную, бромистоводородную, серную, азотную, хлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, толуол-п-сульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и т. п. Другие кислоты, такие как щавелевая, хотя сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут использоваться в получении солей, применимых в качестве промежуточных соединений при получении соединений по настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты.

**[0086]** Иллюстративные основания включают без ограничения гидроксиды щелочных металлов (например, натрия), гидроксиды щелочноземельных металлов

(например, магния), аммиак и соединения формулы  $NW_4^+$ , где W представляет собой  $C_{1-4}$ алкил, и т. п.

**[0087]** Иллюстративные соли включают без ограничения ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, флюкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат, ундеканоат и т. п. Другие примеры солей включают анионы соединений по настоящему изобретению, составленные с подходящим катионом, таким как  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  и  $NW_4^+$  (где W представляет собой  $C_{1-4}$ алкильную группу) и т. п.

**[0088]** Применительно к терапевтическому применению соли соединений по настоящему изобретению рассматриваются как фармацевтически приемлемые. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут находить применение, например, в получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения.

**[0089]** Используемый в данном документе BAFF-R (также известный как рецептор BAFF, рецептор фактора активации В-клеток, BR3, TNFRSF13C, член 13C суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, член 13C суперсемейства рецепторов TNF, CD268 и рецептор 3 BlyS) относится к белку под номером доступа в Uniprot Q96RJ3 и родственным изоформам и ортологам.

**[0090]** На протяжении всего описания, когда композиции описываются как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или когда процессы и способы описываются как имеющие, включающие или предусматривающие конкретные стадии, предполагается, что дополнительно предусматриваются композиции по настоящему изобретению, которые состоят по существу из или состоят из перечисленных компонентов, а также что предусматриваются процессы и способы в соответствии настоящим изобретением, которые состоят по существу или состоят из указанных стадий обработки.

**[0091]** В большинстве случаев процентное содержание в случае композиций, для которых оно указывается, приводится по весу, если конкретно не указано иное. Кроме

того, если переменная не сопровождается определением, то приоритет отдается предыдущему определению переменной.

[0092] Различные признаки и аспекты настоящего изобретения более подробно обсуждаются ниже.

## I. Антигенсвязывающий участок

[0093] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R человека.

Последовательности VH, VL, CDR и scFv иллюстративных антигенсвязывающих участков перечислены в таблице 1. Последовательности CDR идентифицируют в соответствии со схемой нумерации согласно Chothia.

**Таблица 1. Последовательности иллюстративных антигенсвязывающих участков, которые связывают BAFF-R**

Клон	VH	VL
1129_A01 (scFv AB0369)	EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTMLRGLII EDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:77)  CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RFTMLRGLIIEDYGMDV (SEQ ID NO:3)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)  CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
1203_A01	CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)	CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:8)  CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:9)

	CDR3: RFTMLRGVFIEDYGMDV (SEQ ID NO:7)	CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
1203_A02	CDR1: GFTFSTY (SEQ ID NO:10)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RNTMVRGVIIEDYGMDV (SEQ ID NO:11)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSSPLT (SEQ ID NO:12)
AB0605scfv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTMLRGQYI EDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:64)  CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:13)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)  CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
AB0606scfv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTMLRGWY IEDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:65)  CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)  CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)

	CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:14)	CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
AB0622scfv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTMLRGWII EDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:66)  CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RFTMLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:15)	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)  CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
Консенсусная последовательность 1 (AB0605, AB0606, AB0622)	CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RFTMLRGX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> IEDYGMDV, где X <sub>1</sub> представляет собой Q или W, и X <sub>2</sub> представляет собой I или Y (SEQ ID NO:16)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
AB0679scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFPFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTMLRGWY IEDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:67)	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)

	<p>CDR1: GFPFSSY (SEQ ID NO:17)</p> <p>CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)</p> <p>CDR3:</p> <p>RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:14)</p>	<p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)</p>
AB0681scFv	<p>EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSC AASGEWFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAWIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTHLRGWII EDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:68)</p> <p>CDR1: GEWFSSY (SEQ ID NO:18)</p> <p>CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)</p> <p>CDR3: RFTHLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:19)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)</p>
AB0682scFv	<p>EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSC AASGFTFSSSGMHWVRQAPGK CLEWVAWIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTHLRGWY IEDYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:69)</p> <p>CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:20)</p> <p>CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)</p>

	CDR3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:14)	
Консенсусная последовательность 2 (AB0679, AB0681, AB0682)	CDR1: GX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> FSSX <sub>3</sub> , где X <sub>1</sub> представляет собой F или E, X <sub>2</sub> T, P или W, X <sub>3</sub> представляет собой Y или S (SEQ ID NO:21)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGWX <sub>2</sub> IEDYGMDV, где X <sub>1</sub> представляет собой M или H, X <sub>2</sub> представляет собой I или Y (SEQ ID NO:22)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
AB0898	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSSGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTRLRGWYI EDYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:70)  CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:20)  CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23)  CDR3: RFTRLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:32)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)  CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
AB0899	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSSGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL	EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF

	<p>RDEDTAVYYCARRFTYLRGWYI EDYGLDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:71)</p> <p>CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:20)</p> <p>CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23)</p> <p>CDR3: RFTYLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:24)</p>	<p>LTISLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)</p>
AB0900	<p>EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSSGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTSLRGWYI EDYGLDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:72)</p> <p>CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:20)</p> <p>CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23)</p> <p>CDR3: RFTSLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:25)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)</p>
Консенсусная последователь ность 3 (AB0898, AB0899, AB0900)	<p>CDR1: GFTFSSS (SEQ ID NO:20)</p> <p>CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23)</p> <p>CDR3: RFTXLRGWYIEDYGLDV, где X представляет собой R, Y или S (SEQ ID NO:26)</p>	<p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)</p>
AB1080scFv	<p>EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF</p>

	<p>RDEDTAVYYCARRFTHLRGWYI EDYGLDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:73)</p> <p>CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1)</p> <p>CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23)</p> <p>CDR3: RFTHLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:27)</p>	<p>LTISLQPEDFATYYCQQSYSIP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:43)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:39)</p>
AB1081scFv	<p>EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFAFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDESNKYYGDSV KGRFTISRDNRSNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTNLRGWII EDYGLDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:74)</p> <p>CDR1: GFAFSSY (SEQ ID NO:28)</p> <p>CDR2: WYDESN (SEQ ID NO:29)</p> <p>CDR3: RFTNLRGWIIEDYGLDV (SEQ ID NO:30)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQSYSIP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:43)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:39)</p>
AB1084scFv	<p>EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSMYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTRLRGWYI EDYGLDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:75)</p> <p>CDR1: GFTFSMY (SEQ ID NO:31)</p> <p>CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDF LTISLQPEDFATYYCQQSYSIP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:43)</p> <p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p>

	CDR3: RFTRLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:32)	CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:39)
AB1085scFv	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFGSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDGSNKYYGDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTHLRGQYI EDYGMDVWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:76)  CDR1: GFTFGSY (SEQ ID NO:33)  CDR2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)  CDR3: RFTHLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:34)	EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP LTFGCGTKVEIK (SEQ ID NO:63)  CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSTPLT (SEQ ID NO:6)
Консенсусная последователь ность 4 (AB1080, AB1081, AB1084, AB1085)	CDR1: GFX <sub>1</sub> FX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> Y, где X <sub>1</sub> представляет собой T или A, X <sub>2</sub> представляет собой S или G, X <sub>3</sub> представляет собой S или M (SEQ ID NO:35)  CDR2: WYDXSN, где X представляет собой G, A или E (SEQ ID NO:36)  CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> IEDYGX <sub>4</sub> DV, где X <sub>1</sub> представляет собой H, N или R , X <sub>2</sub> представляет собой W или Q, X <sub>3</sub> представляет собой I или Y, X <sub>4</sub> представляет собой M или L (SEQ ID NO:37)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSXPLT, где X представляет собой T или I (SEQ ID NO:49)

<p>AB1424/ AB1612</p>	<p>EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTHLRGQY <b>IEDYGLDVWGQGTTVTVSS</b> (SEQ ID NO:40) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:38)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR <b>ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL</b> LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC<b>QQSYSI</b> <b>PLTFGGG</b>TKVEIK (SEQ ID NO:41) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:39)</p>
<p>AB1424/1612 (с мутациями гетеродимери зации цистеина для образования дисульфидног о мостика)</p>	<p>EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSC AASGFTFSSYGMHWVRQAPGK CLEWVAVIWYDASNKYYGDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RDEDTAVYYCARRFTHLRGQY <b>IEDYGLDVWGQGTTVTVSS</b> (SEQ ID NO:42) CDR1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1) CDR2: WYDASN (SEQ ID NO:23) CDR3: RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:38)</p>	<p>EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR <b>ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL</b> LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYC<b>QQSYSI</b> <b>PLTFGCG</b>TKVEIK (SEQ ID NO:43) CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5) CDR3: QQSYSIPLT (SEQ ID NO:39)</p>
<p>AB1424/1612 scFv (VH-VL)</p>	<p>EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCL EWVAVIWYDASNKYYGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRDED TAVYYCARRFTHLRGQY<b>IEDYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGG</b> <b>GSGGGGSGGGG</b>SEIVLTQSPSSLSASVGDRVITICR<b>ASQSISSYLNWY</b> <b>QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTD</b>FTLTISSLQPEDFAT YYC<b>QQSYSIPLTFGCG</b>TKVEIK</p>	

	(SEQ ID NO:44)	
AB 1424/1612 scFv (VL-VH)	EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPL TFGCGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVQSGGGVVQP GRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKCLEWVAVIWYDASNK YYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCARRFTHL <b>RGQYIEDYGLDVWGQGT</b> TVTVSS (SEQ ID NO:45)	
Консенсусная последователь ность 5  (AB0369, AB1080, AB1085, AB1424/AB16 12)	CDR1: GFTFXSY, где X представляет собой S или G (SEQ ID NO:46)  CDR2: WYDXSN, где X представляет собой G или A (SEQ ID NO:47)  CDR3: RFTX <sub>1</sub> LRGX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> IEDYGX <sub>4</sub> DV, где X <sub>1</sub> представляет собой M или H, X <sub>2</sub> представляет собой L, W или Q, X <sub>3</sub> представляет собой I или Y, X <sub>4</sub> представляет собой M или L (SEQ ID NO:48)	CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)  CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)  CDR3: QQSYSXPLT, где X представляет собой T или I (SEQ ID NO:49)

<p>Консенсусная последовательность 6 (основная консенсусная последовательность)</p>	<p>CDR1: <b>GX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>FX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub></b> где X<sub>1</sub> представляет собой F или E, X<sub>2</sub> представляет собой T, P, W или A, X<sub>3</sub> представляет собой S или G, X<sub>4</sub> представляет собой S или M, X<sub>5</sub> представляет собой Y или S (SEQ ID NO:50)</p> <p>CDR2: <b>WYDXSN</b>, где X представляет собой G, A или E (SEQ ID NO:51)</p> <p>CDR3: <b>RFTX<sub>1</sub>LRGX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>IEDYGX<sub>4</sub>DV</b>, где X<sub>1</sub> представляет собой M, H, N, R, Y или S, X<sub>2</sub> представляет собой L, Q или W, X<sub>3</sub> представляет собой I или Y, X<sub>4</sub> представляет собой M или L (SEQ ID NO:52)</p>	<p>CDR1: RASQSISSYLN (SEQ ID NO:4)</p> <p>CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:5)</p> <p>CDR3: QQSYSXPLT, где X представляет собой T или I (SEQ ID NO:49)</p>
<p>3A1</p>	<p><b>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSC KASGYTFTSYWMHWVKQRPG QGLEWIGEIDPFDSYTNYNQNF KGKATLTVDKSSSTAYMLLSSL TSDDSAVYYCARERLRLWSYY FDYWGQGTTTLTVSS</b> (SEQ ID NO:54)</p> <p>CDR1: <b>GYTFTSY</b> (SEQ ID NO:80)</p> <p>CDR2: <b>DPFDSY</b> (SEQ ID NO:81)</p> <p>CDR3: <b>ERLRLWSYYFDY</b> (SEQ ID NO:82)</p>	<p><b>DVVMVTQTPLSLPVS LGDQASISC RSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPKLLIYKVS NRLSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VY YCFQGSHPFTFGSGTKLEIK</b> (SEQ ID NO:55)</p> <p>CDR1: <b>RSSQSIVHSNGNTYLE</b> (SEQ ID NO:83)</p> <p>CDR2: <b>KVS NRLS</b> (SEQ ID NO:84)</p> <p>CDR3: <b>FQGSHPFT</b> (SEQ ID NO:85)</p>

<p>7G4</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSC                  KASGYTFTSYWMHWVKQRPG                  QGLEWIGEVD<b>PSDSY</b>TNYNQKF                  KGKATLTVDKSSSTAYILLSNLT                  SDDSAVYYCAR<b>ERVRLWSYFF</b>  <b>DYWGQG</b>TTLTVSS (SEQ ID                  NO:56)                  CDR1: GYTFTSY (SEQ ID NO:80)                  CDR2: DPSDSY (SEQ ID NO:86)                  CDR3: ERVRLWSYFFDY (SEQ                  ID NO:87)</p>	<p>DVVMQTPLSLPVSLGDQASISC  <b>RSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP</b>                  GQSPKLLIY<b>KVSNRLSGVPDRFS</b>                  GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY  <b>YCFQGS</b>HDPFTFGSGTKLEIK                  (SEQ ID NO:57)                  CDR1: RSSQSIVHSNGNTYLE                  (SEQ ID NO:83)                  CDR2: KVSNRLS (SEQ ID NO:84)                  CDR3: FQGSHPFT (SEQ ID                  NO:85)</p>
<p>1B3-A7</p>	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSC                  VVSGFTFSNYAMSWVRQTPEK                  RLEWVATIS<b>DGGGY</b>TYYPDSV                  KGRFTISRDNAKNNLYLQMSHL                  KSEDTAIYYCAR<b>DDLGGGNYV</b>  <b>SSYFDV</b>WGTGTTVTVSS (SEQ                  ID NO:58)                  CDR1: GFTFSNY (SEQ ID NO:88)                  CDR2: DGGGY (SEQ ID NO:89)                  CDR3: DDLGGGNYVSSYFDV                  (SEQ ID NO:90)</p>	<p>DVVMQTPLSLPVSPGDQASISC  <b>RSSQSLVHSNGNTYLYWYLQKP</b>                  GQSPKLLIY<b>RVSNRFS</b>GVDPDRFS                  GSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVY  <b>FCFQG</b>THVPLTFGSGTKLELK                  (SEQ ID NO:59)                  CDR1: RSSQSLVHSNGNTYLY                  (SEQ ID NO:91)                  CDR2: RVSNRFS (SEQ ID NO:92)                  CDR3: FQGTHVPLT (SEQ ID                  NO:93)</p>
<p>10H7-C5</p>	<p>EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSC                  AASGF<b>SFSRY</b>AMSWVRQTPEK                  RLEWVATIS<b>DGGSY</b>THYRDNV                  KGRFTISRDNAKNNLNLQMSHL                  KSEDTAIYYCARN<b>MGLYFDY</b></p>	<p>DIVMTQTPLSLPVSLGDQASIS<b>CR</b>  <b>SSQSLLHSNGNTYLYWYLQKPG</b>                  QSPKLLI<b>HRVSNRFS</b>GVDPDRFGG                  SSGSGTDFTLKIIRVEAEDLGVY<b>FC</b>  <b>FQGTHV</b>PWTFGGG<b>TKLEIK</b>                  (SEQ ID NO:79)</p>

	<b>DVYAMDYWGQGTSVTVSS</b> (SEQ ID NO:60)	CDR1: RSSQSLLSNGNTYLY (SEQ ID NO:97)
	CDR1: GFSFSRY (SEQ ID NO:94)	CDR2: RVSNRFS (SEQ ID NO:92)
	CDR2: DGGSY (SEQ ID NO:95)	CDR3: FQGTHVPWT (SEQ ID NO:53)
	CDR3: NEMGLYFDYDVYAMDY (SEQ ID NO:96)	

**[0094]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит вариабельный домен тяжелой цепи антитела (VH), который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную VH антитела, раскрытого в таблице 1, и вариабельный домен легкой цепи антитела (VL), который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную VH того же антитела, раскрытого в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, определенные согласно Kabat (см. Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), Chothia (см, например, Chothia C & Lesk A M, (1987), J Mol Biol 196: 901-917), MacCallum (см. MacCallum R M et al., (1996) J. Mol. Biol. 262: 732-745) или любому другому известному из уровня техники способу определения CDR последовательностей VH и VL антитела, раскрытого в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела, раскрытого в таблице 1.

**[0095]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51 и SEQ ID

NO:52 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:49 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 50, 51 и 52 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 49 соответственно.

**[0096]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0369. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:77, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0097]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из 1203\_A01. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 7 соответственно. В определенных

вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 8, 9 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 7 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 8, 9 и 6 соответственно.

**[0098]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из 1203\_A02. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 2 и 11 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 12 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 2 и 11 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 12 соответственно.

**[0099]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 под SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:16. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 16 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0100]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0605scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей

мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:64, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 13 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (а) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 13 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0101]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0606scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:65, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 14 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6

соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (а) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 14 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0102]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0622scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:66, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 15 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (а) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 2 и 15 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0103]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 под SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:22. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий

участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 21, 2 и 22 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0104]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0679scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:67, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 17, 2 и 14 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 17, 2 и 14 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0105]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0681scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:68, и VL, который содержит

аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 18, 2 и 19 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 18, 2 и 19 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0106]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0682scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:69, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 2 и 14 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 2 и 14 соответственно; и (b)

VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0107]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 под SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:26. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 26 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0108]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0898. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:70, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 32 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 32 соответственно; и (b)

VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0109]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0899. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:71, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 24 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 24 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 24 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0110]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB0900. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:72, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 25 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 20, 23 и 25 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0111]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 под SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36 и SEQ ID NO:37. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:49 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 35, 36 и 37 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0112]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB1080scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:73, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:43. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 23 и 27 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 23 и 27 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно.

**[0113]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB1081scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:74, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:43. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно.

**[0114]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB1084scFv. Например, в определенных

вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:75, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:43. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 31, 23 и 32 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 31, 23 и 32 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно.

**[0115]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB1085scFv. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:76, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33, 2 и 34 соответственно. В

определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 33, 2 и 34 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

**[0116]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2, и CDR3 под SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 и SEQ ID NO:48. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VL, содержащий аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 под SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:49 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 46, 47 и 48 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 49 соответственно.

**[0117]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из AB1424 или AB1612. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:41. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере

93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:42, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:43. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 23 и 38 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (а) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1, 23 и 38 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, где scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO: 44 или 45.

**[0118]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из 3A1. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:54, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:55. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80, 81 и 82 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 83, 84 и 85 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80, 81 и 82 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 83, 84 и 85 соответственно.

**[0119]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из 7G4. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:56, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:57. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80, 86 и 87 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 83, 84 и 85 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 80, 86 и 87 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 83, 84 и 85 соответственно.

**[0120]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из 1B3-A7. Например, в определенных вариантах

осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:58, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:59. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 88, 89 и 90 соответственно. В определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 91, 92 и 93 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 88, 89 и 90 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 91, 92 и 93 соответственно.

**[0121]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению получен из 10H7-C5. Например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению содержит VH, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:60, и VL, который содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:79. В определенных вариантах осуществления VH содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 94, 95 и 96 соответственно. В

определенных вариантах осуществления VL содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 97, 92 и 53 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит (a) VH, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 94, 95 и 96 соответственно; и (b) VL, который содержит CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 97, 92 и 53 соответственно.

**[0122]** В каждом из вышеприведенных вариантов осуществления в данном документе предполагается, что последовательности VH и/или VL, которые вместе связывают BAFF-R, могут содержать аминокислотные изменения (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 10 аминокислотных замен, делеций или добавлений) в каркасных областях VH и/или VL без существенного влияния на их способность связываться с BAFF-R.

**[0123]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению связывает BAFF-R человека с  $K_D$  (т. е. константой диссоциации), составляющей 1 нМ или меньше, 5 нМ или меньше, 10 нМ или меньше, 15 нМ или меньше или 20 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, с применением способа, описанного в примере 1 ниже) или посредством биослойной интерферометрии (BLI), и/или связывает BAFF-R из биологической жидкости, ткани и/или клетки субъекта. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению характеризуется  $K_d$  (т. е. скоростью диссоциации, также называемой  $K_{off}$ ), составляющей  $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ , 0,01, 0,02 или 0,05 1/с или меньше, как измерено посредством SPR (например, с применением способа, описанного в примере 1 ниже) или посредством BLI.

**[0124]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению связывает BAFF-R яванского макака с  $K_D$  (т. е. константой диссоциации), составляющей 5 нМ или меньше, 10 нМ или меньше, 15 нМ или меньше, 20 нМ или меньше или 30 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, с применением способа, описанного в примере 1 ниже) или посредством биослойной интерферометрии (BLI), и/или связывает BAFF-R из биологической жидкости, ткани и/или клетки субъекта. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению

характеризуется  $K_d$  (т. е. скоростью диссоциации, также называемой  $K_{off}$ ), составляющей  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ , 0,01, 0,02 или 0,03 1/с или меньше, как измерено посредством SPR (например, с применением способа, описанного в примере 1 ниже) или посредством BLI.

**[0125]** В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен антигенсвязывающий участок, который конкурирует за связывание с BAFF-R (например, BAFF-R человека) с антигенсвязывающим участком, описанным выше. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению конкурирует за связывание с BAFF-R с антигенсвязывающим участком, полученным из раскрытого выше AB1424. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание с BAFF-R с AB1424. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению конкурирует за связывание с BAFF-R с антигенсвязывающим участком, полученным из раскрытого выше гуманизованного AB1423. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание с BAFF-R с гуманизованным AB1424. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению конкурирует за связывание с BAFF-R с антигенсвязывающим участком, полученным из раскрытого выше AB1612. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание с BAFF-R с AB1612. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению конкурирует за связывание с BAFF-R с антигенсвязывающим участком, полученным из раскрытого выше гуманизованного AB1612. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание с BAFF-R с гуманизованным AB1612. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок по настоящему изобретению конкурирует за связывание с BAFF-R с антигенсвязывающим участком, полученным из раскрытых выше AB0369, 1203\_A01, 1203\_A02, AB0605, AB0606, AB0622, AB0679, AB0681, AB0682, AB0898, AB0899, AB0900, AB1080, AB1081, AB1084, AB1085, 3A1, 7G4, 1B3-A7 или 10H7-C5. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок конкурирует за связывание с BAFF-R с AB0369, 1203\_A01, 1203\_A02, AB0605, AB0606, AB0622, AB0679, AB0681, AB0682, AB0898, AB0899, AB0900, AB1080, AB1081, AB1084, AB1085, 3A1, 7G4, 1B3-A7 или 10H7-C5.

**Белки с антигенсвязывающими участками**

**[0126]** Раскрытый в данном документе антигенсвязывающий участок может присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте. Антитело может представлять собой моноклональное антитело, химерное антитело, диатело, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fv, биспецифическое антитело, биспецифический Fab2, биспецифическое (mab)<sub>2</sub>, гуманизированное антитело, искусственно созданное человеческое антитело, биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, биспецифический активатор, привлекающий NK-клетки, одноцепочечное антитело (например, одноцепочечный Fv-фрагмент или scFv), Triomab, IgG с общей легкой цепью, полученный посредством подхода "выступы-во впадины" (kih), Crossmab, IgG с орто-Fab, DVD-Ig, IgG "2 в 1", IgG-scFv, sdFv2-Fc, би-наноантитело, tandAb, перенацеливающееся антитело с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, scFv-HSA-scFv (где HSA = человеческий сывороточный альбумин) или Fab3, полученный посредством подхода "стыковка-и-блокирование" (DNL). В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления scFv находится в формате VH-VL.

**[0127]** В некоторых вариантах осуществления вышеописанный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) включает переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления 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, при этом аминокислотные положения пронумерованы согласно Kabat. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи связан с переменным доменом легкой цепи посредством гибкого линкера. Можно использовать любой подходящий линкер, например, линкер (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> ((GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:98)). В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на N-конце переменного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv переменный домен тяжелой цепи расположен на C-конце переменного домена легкой цепи.

**[0128]** Предполагается, что в scFv VH и VL могут быть соединены линкером, например, (GlyGlyGlyGlySer)<sub>4</sub>, т. е. линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:98). Специалисту в

данной области техники будет понятно, что любой из других раскрытых линкеров (см., например, таблицу 2) можно применять в scFv, имеющем последовательности VH и VL, раскрытые в данном документе (например, в таблице 1).

**[0129]** С точки зрения своей длины линкер (например, гибкий линкер) может быть "коротким", например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков, или "длинным", например, по меньшей мере 13 аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления длина линкера составляет 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, 15-20, 20-50, 20-40, 20-30, или 20-25 аминокислотных остатков.

**[0130]** В определенных вариантах осуществления линкер содержит последовательности (GS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:109), (GGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:110), (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:111), (GGSG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:112), (GGSGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:113) и (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:114), где n составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, или состоит из них. В определенных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:98-108, перечисленных в **таблице 2**, или состоит из нее.

<b>Таблица 2</b>	
SEQ ID	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:99	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS
SEQ ID NO:100	GGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGGSGG
SEQ ID NO:101	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GS
SEQ ID NO:102	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG G
SEQ ID NO:103	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGG
SEQ ID NO:104	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSGGGG
SEQ ID NO:98	GGGGSGGGSGGGSGGGG
SEQ ID NO:105	GGGGSGGGSGGGG

SEQ ID NO:106	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GSGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
SEQ ID NO:107	GGSGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGSGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GSGGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
SEQ ID NO:108	SGSGGGGS

**[0131]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, связан с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%) идентичной константной области антитела, например, константным областям тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE; в частности, выбранным, например, из константных областей тяжелой цепи (например, человека) IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В другом варианте осуществления антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, может быть связан с константной областью легкой цепи, выбранной, например, из константных областей легкой цепи (например, человека) каппа или лямбда. Константная область может быть изменена, например, мутирована, для модификации свойств антитела (например, для повышения или снижения одного или нескольких из связывания Fc-рецептора, гликозилирования антитела, числа остатков цистеина, функции эффекторных клеток и/или функции комплемента). В одном варианте осуществления антитело характеризуется эффекторной функцией и способно фиксировать комплемент. В других вариантах осуществления антитело не рекрутирует эффекторные клетки или не фиксирует комплемент. В другом варианте осуществления антитело характеризуется сниженной способностью к связыванию Fc-рецептора или вообще не характеризуется ею. Например, оно относится к изотипу или подтипу, представляет собой фрагмент или другой мутантный вариант, которые не поддерживают связывание с Fc-рецептором, например, оно содержит измененную с применением мутагена или делетированную область связывания Fc-рецептора.

**[0132]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок связан с константной областью IgG, включающей шарнир, домены CH2 и CH3 с доменом CH1 или без него. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная

последовательность константной области на по меньшей мере 90% (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентична константной области человеческого антитела, такой как константная область человеческого IgG1, константная область человеческого IgG2, константная область человеческого IgG3 или константная область человеческого IgG4. В одном варианте осуществления Fc-домен антитела или его часть, достаточная для связывания CD16, содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную последовательности Fc человеческого IgG1 дикого типа.

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:61). В некоторых других вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентична константной области антитела другого млекопитающего, такого как кролик, собака, кошка, мышь или лошадь. Одна или несколько 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. Иллюстративные замены 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.

**[0133]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок связан с частью Fc-домена антитела, достаточной для связывания CD16. В пределах Fc-

домена связывание CD16 опосредуется шарнирной областью и доменом CH2.

Например, в пределах человеческого 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-глюкозамине в домене CH2 (см. Sonderrmann *et al.*, Nature, 406 (6793):267-273). На основе известных доменов можно выбирать мутации для усиления или снижения аффинности связывания с CD16, как например с использованием библиотек, представленных в фаговом дисплее, или библиотек cDNA, отображаемых на поверхности дрожжей, или их можно разрабатывать на основе известной трехмерной структуры взаимодействия.

**[0134]** В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в CH1 константной области человеческого IgG1, могут затрагивать аминокислоты V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 и/или V173. В определенных вариантах осуществления мутации, которые могут быть включены в Cк константной области человеческого IgG1, могут затрагивать аминокислоты E123, F116, S176, V163, S174 и/или T164.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления константный домен антитела содержит домен CH2 и домен CH3 антитела IgG, например, человеческого антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления мутации вводят в константный домен антитела, чтобы обеспечить гетеродимеризацию с другим константным доменом антитела. Например, если константный домен антитела получен из константного домена человеческого IgG1, то константный домен антитела может содержать аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотам 234-332 человеческого антитела IgG1 и отличающуюся в одном или нескольких положениях, 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. Все аминокислотные положения в Fc-домене или шарнирной области, раскрытые в данном документе, пронумерованы в соответствии с нумерацией EU.

**[0136]** Для облегчения образования асимметричного белка предполагается гетеродимеризация Fc-доменов. Мутации (например, аминокислотные замены) в Fc-домене, которые способствуют гетеродимеризации, описаны, например, в публикации

международной патентной заявки № WO2019157366, которая не включена в данный документ посредством ссылки.

**[0137]** Белки, описанные выше, можно получать с применением технологии рекомбинантной ДНК, хорошо известной специалисту в данной области техники. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в первый вектор экспрессии; вторая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована во второй вектор экспрессии; третья последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первую легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в третий вектор экспрессии; четвертая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вторую легкую цепь иммуноглобулина, может быть клонирована в четвертый вектор экспрессии; при этом первый, второй, третий и четвертый векторы экспрессии можно стабильно трансфицировать вместе в клетки-хозяева, чтобы они продуцировали мультимерные белки.

**[0138]** Для достижения наиболее высокого выхода белков можно исследовать различные соотношения первого, второго, третьего и четвертого векторов экспрессии, чтобы определить оптимальное соотношение для трансфекции в клетки-хозяева. После трансфекции отдельные клоны могут быть выделены для создания банка клеток с применением способов, известных из уровня техники, таких как предельное разбавление, ELISA, FACS, микроскопия или Clonепix.

**[0139]** Клоны можно культивировать в условиях, подходящих для масштабирования при продуцировании в биореакторе и для поддержания экспрессии белка, содержащего антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе. Белок можно выделить и очистить с применением способов, известных из уровня техники, включая центрифугирование, глубинную фильтрацию, лизис клеток, гомогенизацию, замораживание-оттаивание, аффинную очистку, гель-фильтрацию, ионообменную хроматографию, ионообменную хроматографию с гидрофобным взаимодействием и хроматографию со смешанным режимом.

**[0140]** Соответственно, в другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены одна или несколько выделенных нуклеиновых кислот, содержащих последовательности, кодирующие переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и/или легкой цепи иммуноглобулина из любого из вышеуказанных

антител. В настоящем изобретении предусмотрены один или несколько векторов экспрессии, которые экспрессируют переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина и/или легкой цепи иммуноглобулина из любого из вышеуказанных антител. Аналогичным образом, в настоящем изобретении предусмотрены клетки-хозяева, содержащие одно или несколько из вышеуказанных векторов экспрессии и/или выделенных нуклеиновых кислот.

**[0141]** В определенных вариантах осуществления антитело связывает BAFF-R с  $K_D$ , составляющей 25 нМ, 20 нМ, 15 нМ, 10 нМ, 9 нМ, 8 нМ, 7 нМ, 6 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,1 нМ или меньше, как измерено с применением стандартных анализов связывания, например, поверхностного плазмонного резонанса или биослойной интерферометрии. В определенных вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, связывает BAFF-R с  $K_D$ , составляющей менее 5 нМ. В определенных вариантах осуществления антитело связывает BAFF-R из биологической жидкости, ткани и/или клетки субъекта. В определенных вариантах осуществления антитело, раскрытое в данном документе, ингибирует (например, блокирует) связывание BAFF-R с BAFF (например, на по меньшей мере 50%, 75%, 90%, 95% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания).

**[0142]** Из уровня техники известны конкурентные анализы для определения того, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и раскрытое антитело, или конкурирует ли оно за связывание с ним. Иллюстративные конкурентные анализы включают иммуноанализы (например, анализы ELISA, анализы RIA), поверхностный плазмонный резонанс (например, анализ VIAcore), биослойную интерферометрию и проточную цитометрию.

**[0143]** Как правило, конкурентный анализ предусматривает применение антигена (например, белка BAFF-R человека или его фрагмента), связанного с твердой поверхностью или экспрессируемого на клеточной поверхности, тестируемого BAFF-R-связывающего антитела и эталонного антитела. Эталонное антитело является меченым, а тестируемое антитело является немеченым. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества меченого эталонного антитела, связанного с твердой поверхностью или клетками, в присутствии тестируемого антитела. Обычно тестируемое антитело присутствует в избытке (например, в 1x, 5x, 10x, 20x или 100x). Антитела, идентифицированные посредством конкурентного анализа (например, конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом или

аналогичными (например, перекрывающимися) эпитопами, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, достаточно близким к эпитопу, связанному эталонным антителом, для возникновения стерических препятствий.

**[0144]** Конкурентный анализ можно проводить в обоих направлениях, чтобы гарантировать, что присутствие метки не препятствует или иным образом не ингибирует связывание. Например, в первом направлении эталонное антитело является меченым, а тестируемое антитело является немеченым, а во втором направлении тестируемое антитело является меченым, а эталонное антитело является немеченым.

**[0145]** Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом за специфическое связывание с антигеном, если избыток одного антитела (например, 1x, 5x, 10x, 20x или 100x) ингибирует связывание другого антитела, например, на по меньшей мере 50%, 75%, 90%, 95% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания.

**[0146]** Можно определить, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Можно определить, что два антитела связываются с перекрывающимися эпитопами, если только подгруппа аминокислотных мутаций, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижает или устраняет связывание другого.

**[0147]** Антитела, раскрытые в данном документе, могут быть дополнительно оптимизированы (например, подвергнуты созреванию аффинности) для улучшения биохимических характеристик, включая аффинность и/или специфичность, улучшения биофизических свойств, включая агрегацию, стабильность, преципитацию и/или неспецифические взаимодействия, и/или для снижения иммуногенности. Процедуры созревания аффинности известны специалистам в данной области техники. Например, разнообразие может быть введено в тяжелую цепь иммуноглобулина и/или легкую цепь иммуноглобулина посредством шаффлинга ДНК, шаффлинга цепей, шаффлинга CDR, случайного мутагенеза и/или сайт-специфического мутагенеза.

**[0148]** В определенных вариантах осуществления выделенные человеческие антитела содержат одну или несколько соматических мутаций. В этих случаях антитела можно модифицировать с получением человеческой последовательности зародышевого

типа для оптимизации антитела (например, посредством способа, называемого приведение к генам зародышевого типа).

**[0149]** Обычно оптимизированное антитело характеризуется по меньшей мере такой же или практически такой же аффинностью к антигену, что и неоптимизированное (или исходное) антитело, из которого оно получено.

Предпочтительно оптимизированное антитело характеризуется более высокой аффинностью к антигену по сравнению с исходным антителом.

**[0150]** Если антитело предназначено для применения в качестве терапевтического средства, оно может быть конъюгировано с эффекторным средством, таким как низкомолекулярный токсин или радионуклид, с применением стандартных химических методов конъюгации *in vitro*. Если эффекторное средство представляет собой полипептид, то антитело может быть химически конъюгировано с эффектором или присоединено к эффектору в виде слитого белка. Конструирование слитых белков известно специалистам в данной области техники.

**[0151]** Антитело может быть конъюгировано с эффекторным компонентом, таким как низкомолекулярный токсин или радионуклид, с применением стандартных химических методов конъюгации *in vitro*. Если эффекторный компонент представляет собой полипептид, то антитело может быть химически конъюгировано с эффектором или присоединено к эффектору в виде слитого белка. Конструирование слитых белков известно специалистам в данной области техники.

***T-клетки с CAR, BAFF-R/CD3-направленные биспецифические активаторы, привлекающие T-клетки, иммуноцитокнины, конъюгаты антитело-лекарственное средство и иммунотоксины***

**[0152]** В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены молекула или комплекс, содержащие антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе. Иллюстративные молекулы или комплексы включают без ограничения химерные антигенные рецепторы (CAR), активаторы, привлекающие T-клетки (например, BAFF-R/CD3-направленные биспецифические активаторы, привлекающие T-клетки), иммуноцитокнины, конъюгаты антитело-лекарственное средство и иммунотоксины.

**[0153]** Можно использовать любой антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе. В определенных вариантах осуществления последовательности VH, VL и/или CDR антигенсвязывающего участка,

который связывает BAFF-R, представлены в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%) идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 44 и 45. В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и 45.

**[0154]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, в молекуле или комплексе (например, CAR, активаторе, привлекающем Т-клетки, иммуноцитокине, конъюгате антитело-лекарственное средство или иммунотоксине) содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 1, 23 и 38 соответственно; и вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40 или 42, и вариабельный домен легкой цепи с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:41 или 43. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID

NO:44 или SEQ ID NO:45. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:44.

### *Химерные антигенные рецепторы (CAR)*

[0155] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен CAR, нацеливающийся на BAFF-R, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе (см., например, таблицу 1). CAR, нацеливающийся на BAFF-R, может содержать Fab-фрагмент или scFv.

[0156] Термин “химерный антигенный рецептор” или в качестве альтернативы “CAR” относится к рекомбинантной полипептидной конструкции, содержащей по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, предусматривающий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы (также называемый в данном документе как “первичный сигнальный домен”).

[0157] Соответственно, в определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий первичный сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы (также называемый “костимулирующим сигнальным доменом”).

[0158] В определенных вариантах осуществления CAR предусматривает химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R (например, BAFF-R-связывающий scFv), раскрытый в данном документе, в качестве внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий первичный сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления CAR предусматривает химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R (например, BAFF-R-связывающий scFv), раскрытый в данном документе, в качестве

внуклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий сигнальный домен и первичный сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления CAR предусматривает химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R (например, BAFF-R-связывающий scFv), раскрытый в данном документе, в качестве внуклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два костимулирующих сигнальных домена и первичный сигнальный домен. В определенных вариантах осуществления CAR предусматривает химерный слитый белок, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R (например, BAFF-R-связывающий scFv), раскрытый в данном документе, в качестве внуклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий по меньшей мере два костимулирующих сигнальных домена и первичный сигнальный домен.

**[0159]** Например, в определенных вариантах осуществления внуклеточный антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий участок (например, scFv), содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 1, 23 и 38 соответственно; и вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные аминокислотными последовательностями под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40 или 42, и вариабельный домен легкой цепи с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:41 или 43. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит scFv,

содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит scFv, содержащий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную SEQ ID NO:44.

**[0160]** Что касается трансмембранного домена, то в различных вариантах осуществления CAR сконструирован таким образом, что содержит трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом CAR. В одном варианте осуществления трансмембранный домен представляет собой домен, который естественным образом ассоциирован с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован посредством аминокислотной замены для избегания связывания таких доменов с трансмембранными доменами того же белка или других поверхностных мембранных белков, чтобы свести к минимуму взаимодействия с другими представителями рецепторного комплекса. В другом варианте осуществления трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на поверхности Т-клетки с CAR. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или заменена таким образом, чтобы свести к минимуму взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же Т-клетке с CAR.

**[0161]** Трансмембранный домен может быть получен из любого встречающегося в природе связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном варианте осуществления трансмембранная область способна передавать сигнал внутриклеточному(-ым) домену(-ам) всякий раз, когда CAR связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранную(-ые) область(-и) одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из  $\alpha$ -цепи TCR,  $\beta$ -цепи TCR,  $\zeta$ -цепи TCR, CD28, CD3 $\epsilon$ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, BAFF-R, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, и

CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранную(-ые) область(-и) одного или нескольких белков, выбранных из группы, состоящей из KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R $\beta$ , IL2R $\gamma$ , IL7R $\alpha$ , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D и NKG2C.

**[0162]** Внеклеточный домен, представляющий собой BAFF-R-связывающий домен (например, BAFF-R-связывающий scFv-домен), может быть соединен с трансмембранным доменом посредством шарнирной области. Можно использовать различные шарниры, включая без ограничения шарнир человеческого Ig (иммуноглобулина) (например, шарнир IgG4, шарнир IgD), линкер Gly-Ser, линкер (G4S)<sub>4</sub>, шарнир KIR2DS2 и шарнир CD8 $\alpha$ .

**[0163]** Внутриклеточный сигнальный домен CAR по настоящему изобретению отвечает за активацию по меньшей мере одной из специализированных функций иммунной клетки (например, цитолитической активности или хелперной активности, включая секрецию цитокинов, Т-клетки), на поверхность которой был помещен CAR. Таким образом, используемый в данном документе термин “внутриклеточный сигнальный домен” относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В случае, если используют усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, подразумевается, что термин “внутриклеточный сигнальный домен” включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

**[0164]** Внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит первичный сигнальный домен (т. е. функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы) и один или несколько костимулирующих сигнальных доменов (т. е. функциональных сигнальных доменов, полученных из по меньшей мере одной костимулирующей молекулы).

**[0165]** Используемый в данном документе термин “стимулирующая молекула” относится к молекуле, экспрессируемой иммунной клеткой, например, Т-клеткой, НК-клеткой или В-клеткой, которая обеспечивает цитоплазматическую(-ие) сигнальную(-ые) последовательность(-и), регулиующую(-ие) активацию иммунной клетки стимулирующим образом для по меньшей мере некоторых аспектов сигнального пути иммунной клетки. В одном варианте осуществления сигнал представляет собой первичный сигнал, который инициируется, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, и который приводит к опосредованному Т-клеточному ответу, включая без ограничения пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п.

**[0166]** Первичные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные активирующие мотивы на основе тирозина или ITAM. Примеры ITAM-содержащих цитоплазматических сигнальных последовательностей, которые особенно применимы в настоящем изобретении, включают последовательности, полученные из CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен в любом одном или нескольких CAR по настоящему изобретению содержит цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3-дзета.

**[0167]** В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен представляет собой функциональный сигнальный домен TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, 4-1BB и/или CD3-дзета. В варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен предусматривает функциональный сигнальный домен CD3-дзета, общей гамма-цепи FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и/или DAP12. В конкретном варианте осуществления первичный сигнальный домен представляет собой функциональный

сигнальный домен дзета-цепи, ассоциированный с комплексом Т-клеточного рецептора.

**[0168]** Используемый в данном документе термин “костимулирующая молекула” относится к когнатному партнеру по связыванию на поверхности Т-клетки, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя таким образом костимулирующий ответ Т-клетки, такой как без ограничения пролиферация. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от антигенного рецептора или его лигандов, которая необходима для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1, CD11a/CD18), CD2, CD7, CD258 (LIGHT), NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Дополнительные примеры таких костимулирующих молекул включают CD5, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbr и лиганд, который специфически связывается с CD83. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен CAR представляет собой функциональный сигнальный домен костимулирующей молекулы, описанной в данном документе, например, OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, NKG2C, B7-H3, лиганд, который связывается с CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS и 4-1BB (CD137) или любой их комбинации.

**[0169]** Используемый в данном документе термин “сигнальный домен” относится к функциональной части белка, которая действует посредством передачи информации внутри клетки для регуляции клеточной активности посредством определенных сигнальных путей, вызывая образование вторичных мессенджеров или функционируя в качестве эффекторов посредством ответа на такие мессенджеры.

[0170] Цитоплазматические сигнальные последовательности в пределах цитоплазматической сигнальной части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или точно определенном порядке. Необязательно, соединение может образовывать короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот.

[0171] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующую CAR, нацеливающийся на BAFF-R, раскрытый в данном документе. Нуклеиновая кислота применима для экспрессии CAR в эффекторной клетке (например, Т-клетке) при введении нуклеиновой кислоты в клетку.

[0172] В последовательность могут быть внесены модификации для создания эквивалентного или улучшенного варианта по настоящему изобретению, например, посредством замены одного или нескольких кодонов в соответствии с таблицей вырожденных кодонов. Таблица вырожденных кодонов ДНК представлена в таблице 3.

Таблица 3. Кодоны аминокислот			
Аминокислоты	Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Кодоны
Аланин	A	Ala	GCA GCC GCG GCU
Цистеин	C	Cys	UGC UGU
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GAC GAU
Глутаминовая кислота	E	Glu	GAA GAG
Фенилаланин	F	Phe	UUC UUU
Глицин	G	Gly	GGA GGC GGG GGU

Гистидин	H	His	CAC CAU
Изолейцин	I	Iso	AUA AUC AUU
Лизин	K	Lys	AAA AAG
Лейцин	L	Leu	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Метионин	M	Met	AUG
Аспарагин	N	Asn	AAC AAU
Пролин	P	Pro	CCA CCC CCG CCU
Глутамин	Q	Gln	CAA CAG
Аргинин	R	Arg	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Серин	S	Ser	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Треонин	T	Thr	ACA ACC ACG ACU
Валин	V	Val	GUA GUC GUG GUU
Триптофан	W	Trp	UGG
Тирозин	Y	Tyr	UAC UAU

**[0173]** В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК (например, молекулу cDNA). В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность для контроля экспрессии (например, промотор и/или энхансер), функционально связанную с последовательностью, кодирующей CAR. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту. Вектор может представлять собой вирусный вектор (например, вектор на основе AAV, лентивирусный вектор или аденовирусный вектор) или невирусный вектор (например, плазмиду).

[0174] В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу РНК (например, молекулу mRNA). Способ получения mRNA для применения в трансфекции может включать транскрипцию матрицы *in vitro* со специально разработанными праймерами с последующим добавлением поли-А с получением РНК-конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемые последовательности, 5'-кэп и/или внутренний участок посадки рибосомы (IRES), при этом длина нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии, и хвоста поли-А, как правило, составляет 50-2000 оснований. Молекула РНК может быть дополнительно модифицирована для повышения эффективности трансляции и/или стабильности, например, как раскрыто в патентах США № 8278036; 8883506 и 8716465. Полученными таким образом молекулами РНК можно эффективно трансфицировать различные типы клеток.

[0175] В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, содержащую сигнальный пептид на амино-конце CAR. Такой сигнальный пептид может содействовать локализации CAR на клеточной поверхности, когда он экспрессируется в эффекторной клетке, и отщепляется от CAR в ходе клеточного процессинга. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, содержащую сигнальный пептид на N-конце внеклеточного BAFF-R-связывающего домена (например, BAFF-R-связывающего scFv-домена).

[0176] РНК или ДНК могут быть введены в клетки-мишени с применением любого из множества различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают без ограничения электропорацию, трансфекцию, опосредованную катионными липосомами, с применением липофекции, инкапсуляцию в полимер, трансфекцию, опосредованную пептидами, или биолистические системы доставки частиц, такие как “генные пушки” (см., например, Nishikawa, *et al.* Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)).

[0177] В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR, нацеливающийся на BAFF-R. Также предусмотрена иммунная эффекторная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, нацеливающийся на BAFF-R. Иммунные эффекторные клетки включают без ограничения Т-клетки и NK-клетки. В определенных вариантах

осуществления Т-клетка выбрана из CD8<sup>+</sup> Т-клетки, CD4<sup>+</sup> Т-клетки или НКТ-клетки. Т-клетка или НК-клетка может представлять собой первичную клетку или линию клеток.

**[0178]** Иммунные эффекторныe клетки могут быть получены из множества источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли, посредством способов, известных из уровня техники. Иммунные эффекторныe клетки также можно дифференцировать *in vitro* из плюрипотентных или мультипотентных клеток (например, гемопоэтической стволовой клетки). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена плюрипотентная или мультипотентная клетка (например, гемопоэтическая стволовая клетка), экспрессирующая CAR, нацеливающийся на BAFF-R (например, экспрессирующая CAR на плазматической мембране), или содержащая нуклеиновую кислоту, раскрытую в данном документе.

**[0179]** В определенных вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки выделяют и/или очищают. Например, регуляторные Т-клетки можно удалить из популяции Т-клеток с применением CD25-связывающего лиганда. Эффекторныe клетки, экспрессирующие белок контрольной точки (например, PD-1, LAG-3 или TIM-3), можно удалить сходными способами. В определенных вариантах осуществления эффекторныe клетки выделяют с помощью стадии положительного отбора. Например, популяцию Т-клеток можно выделить посредством инкубации с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/антителами к CD28. Для положительного отбора также можно использовать другие маркеры клеточной поверхности, такие как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзим В и перфорин.

**[0180]** Иммунные эффекторныe клетки могут быть активированы и размножены обычно с применением способов, известных из уровня техники, например, описанных в патентах США № 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и публикациях патентных заявок США № 2006/0121005 и 2016/0340406. Например, в определенных вариантах осуществления Т-клетки можно размножить и/или активировать посредством контакта с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Клетки можно размножить в культуре в течение периода времени, составляющего от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 часов) до приблизительно 14 дней

(например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней). В одном варианте осуществления клетки размножаются в течение периода времени, составляющего от 4 до 9 дней. Многократные циклы стимуляции могут требоваться для длительного культивирования клеток (например, культивирования в течение периода времени, составляющего 60 дней или больше). В определенных вариантах осуществления культура клеток содержит сыворотку крови (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку крови), интерлейкин-2(IL-2), инсулин, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$  или их комбинацию. Другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники, например, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстанавливающие средства, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол, также могут быть включены в культуру клеток. В определенных вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка по настоящему изобретению представляет собой клетку, полученную посредством размножения *in vitro*.

**[0181]** Дополнительные варианты осуществления CAR, нацеливающегося на BAFF-R (например, регулируемого CAR), нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, и эффекторных клеток, экспрессирующих CAR или содержащих нуклеиновую кислоту, представлены в патентах США № 7446190 и 9181527, публикациях заявок на патент США № 2016/0340406 и 2017/0049819 и публикации международной патентной заявки № WO2018/140725.

***BAFF-R/CD3-направленные биспецифические активаторы, привлекающие T-клетки***

**[0182]** В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен BAFF-R/CD3-направленный биспецифический активатор, привлекающий T-клетки, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе. В определенных вариантах осуществления BAFF-R/CD3-направленный биспецифический активатор, привлекающий T-клетки, содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 44 и 45. В

определенных вариантах осуществления цитокин соединен с Fc-доменом напрямую или посредством линкера.

**[0183]** В определенных вариантах осуществления BAFF-R/CD3-направленный биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, дополнительно содержит антигенсвязывающий участок, который связывает CD3. Иллюстративные антигенсвязывающие участки, которые связывают CD3, раскрыты в публикациях международных патентных заявок №№ WO2014/051433 и WO2017/097723.

**[0184]** В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один полипептид BAFF-R/CD3-направленного биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки, где полипептид содержит антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который при экспрессии находится на N-конце одного или нескольких полипептидов BAFF-R/CD3-направленного биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки. Также предусмотрены вектор (например, вирусный вектор), содержащий нуклеиновую кислоту, клетка-продуцент, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, и клетка-продуцент, экспрессирующая BAFF-R/CD3-направленный биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки.

### ***Иммуоцитокينات***

**[0185]** В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен иммуоцитокин, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе, и цитокин. Можно использовать любой цитокин (например, провоспалительные цитокины), известный из уровня техники, включая без ограничения IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, TNF, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и GM-CSF. Другие иллюстративные цитокины раскрыты в патенте США № 9567399. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок соединен с цитокином посредством химической конъюгации (например, ковалентной или нековалентной химической конъюгации). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий участок соединен с цитокином посредством слияния полипептида. Иммуоцитокин может дополнительно содержать Fc-домен, соединенный с антигенсвязывающим участком, который связывает BAFF-R. В определенных вариантах осуществления иммуоцитокин содержит аминокислотную

последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 44 и 45. В определенных вариантах осуществления цитокин соединен с Fc-доменом напрямую или посредством линкера.

**[0186]** В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один полипептид иммуноцитокина, где полипептид содержит антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который при экспрессии находится на N-конце одного или нескольких полипептидов иммуноцитокина. Также предусмотрены вектор (например, вирусный вектор), содержащий нуклеиновую кислоту, клетка-продуцент, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, и клетка-продуцент, экспрессирующая иммуноцитокин.

#### *Конъюгаты антитело-лекарственное средство*

**[0187]** В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе, и компонент, представляющий собой цитотоксическое лекарственное средство. Иллюстративные компоненты, представляющие собой цитотоксические лекарственные средства, раскрыты в публикациях международных патентных заявок №№ WO2014/160160 и WO2015/143382. В определенных вариантах осуществления компонент, представляющий собой цитотоксическое лекарственное средство, выбран из ауристатина, N-ацетил-γ-калихеамицина, майтанзиноида, пирролобензодиазепина и SN-38. Антигенсвязывающий участок может быть соединен с компонентом, представляющим собой цитотоксическое лекарственное средство, посредством химической конъюгации (например, ковалентной или нековалентной химической конъюгации). В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство дополнительно содержит Fc-домен, соединенный с антигенсвязывающим участком, который связывает BAFF-R. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей

мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 44 и 45. В определенных вариантах осуществления компонент, представляющий собой цитотоксическое лекарственное средство, соединен с Fc-доменом напрямую или посредством линкера.

### *Иммунотоксины*

**[0188]** В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен иммунотоксин, содержащий антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, раскрытый в данном документе, и цитотоксический пептидный компонент. Можно использовать любой цитотоксический пептидный компонент, известный из уровня техники, включая без ограничения ризин, дифтерийный токсин и экзотоксин A *Pseudomonas*. Больше иллюстративных цитотоксических пептидов раскрыто в публикациях международных патентных заявок №№ WO2012/154530 и WO2014/164680. В определенных вариантах осуществления цитотоксический пептидный компонент соединен с белком посредством химической конъюгации (например, ковалентной или нековалентной химической конъюгации). В определенных вариантах осуществления цитотоксический пептидный компонент соединен с белком посредством слияния полипептида. Иммунотоксин может дополнительно содержать Fc-домен, соединенный с антигенсвязывающим участком, который связывает BAFF-R. В определенных вариантах осуществления иммунотоксин содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 44 и 45. В определенных вариантах осуществления цитотоксический пептидный компонент соединен с Fc-доменом напрямую или посредством линкера.

**[0189]** В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена нуклеиновая кислота, кодирующая по меньшей мере один полипептид иммунотоксина, где полипептид содержит антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальный пептид, который при экспрессии находится на N-конце одного или нескольких полипептидов

иммунотоксина. Также предусмотрены вектор (например, вирусный вектор), содержащий нуклеиновую кислоту, клетка-продуцент, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, и клетка-продуцент, экспрессирующая иммунотоксин.

## **II. Терапевтические композиции и их применение**

**[0190]** В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения рака или аутоиммунного заболевания с применением белка, конъюгата или клеток, содержащих антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе, и/или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы можно применять для лечения различных видов рака, которые характеризуются экспрессией BAFF-R, посредством введения пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества белка, конъюгата или клеток, содержащих антигенсвязывающий участок, раскрытый в данном документе.

**[0191]** Терапевтический способ может быть охарактеризован в зависимости от вида рака, подлежащего лечению. Рак, подлежащий лечению, может быть охарактеризован в соответствии с присутствием определенного антигена, экспрессируемого на поверхности раковой клетки, например BAFF-R.

**[0192]** Виды рака, характеризующиеся экспрессией BAFF-R, включают без ограничения В-клеточную неходжкинскую лимфому (B-NHL), такую как хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярная лимфома (FL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфома лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL); и аутоиммунные воспалительные заболевания.

**[0193]** Предполагается, что белок, конъюгат, клетки и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, можно применять для лечения различных видов рака, не ограничиваясь видами рака, при которых раковые клетки или клетки в микроокружении раковой опухоли экспрессируют BAFF-R.

**[0194]** В определенных вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В определенных других вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, лейкоз, рак

легкого, рак печени, меланому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак желудка, рак яичка или рак матки. В еще одних вариантах осуществления рак представляет собой васкуляризованную опухоль, плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточную карциному, меланому, глиому, нейробластому, саркому (например, ангиосаркому или хондросаркому), рак гортани, рак околоушной железы, рак желчных протоков, рак щитовидной железы, акральную лентигинозную меланому, актинические кератозы, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, аденоидную кистозную карциному, виды аденомы, аденосаркому, аденосквамозную карциному, рак анального канала, анальный рак, аноректальный рак, астроцитарную опухоль, карциному бартолиновой железы, базальноклеточную карциному, рак желчевыводящих путей, рак кости, рак костного мозга, рак бронхов, бронхиальную железистую карциному, карциноид, холангиокарциному, хондросаркому, папиллому/карциному хориоидного сплетения, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, светлоклеточную карциному, рак соединительной ткани, цистаденому, рак пищеварительной системы, рак двенадцатиперстной кишки, рак эндокринной системы, опухоль эндодермального синуса, гиперплазию эндометрия, стромальную саркому эндометрия, эндометриоидную аденокарциному, эндотелиальноклеточный рак, эпендимальный рак, эпителиальноклеточный 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, виды гемангиобластомы, гемангиоэндотелиому, виды гемангиомы, аденому печени, аденоматоз печени, гепатобилиарный рак, гепатоцеллюлярную карциному, болезнь Ходжкина, рак подвздошной кишки, инсулиному, интраэпителиальную неоплазию, интраэпителиальную плоскоклеточную неоплазию, рак внутривнутрипеченочных желчных протоков, инвазивную плоскоклеточную карциному, рак тощей кишки, рак суставов, саркому Капоши, рак органов малого таза, крупноклеточную карциному, рак толстой кишки, лейомиосаркому, виды злокачественной лентигино-меланомы, лимфому, рак мужских половых органов, злокачественную меланому, злокачественные мезотелиальные опухоли, медуллобластому, медуллоэпителиому, рак мозговых оболочек, мезотелиальный рак, метастатическую карциному, рак ротовой полости, мукоэпидермоидную карциному, множественную миелому, рак мышц, рак носового

канала, рак нервной системы, нейроэпителиальную аденокарциному, узловую меланому, неэпителиальный рак кожи, неходжкинскую лимфому, овсяноклеточную карциному, олигодендроглиальный рак, рак полости рта, остеосаркому, папиллярную серозную аденокарциному, рак полового члена, рак глотки, опухоли гипофиза, плазмоцитому, псевдосаркому, легочную бластому, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, рак дыхательной системы, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому, серозную карциному, рак придаточных пазух носа, рак кожи, мелкоклеточную карциному, рак тонкого кишечника, рак гладких мышц, рак мягких тканей, соматостатин-секретирующую опухоль, рак позвоночника, плоскоклеточную карциному, рак поперечно-полосатых мышц, субмезотелиальный рак, поверхностно-распространяющуюся меланому, виды Т-клеточного лейкоза, рак языка, недифференцированную карциному, рак мочеочника, рак уретры, рак мочевого пузыря, рак мочевыделительной системы, рак шейки матки, рак тела матки, увеальную меланому, рак влагалища, веррукозную карциному, ВИПому, рак вульвы, высокодифференцированную карциному или опухоль Вильмса.

**[0195]** В определенных вариантах осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В определенных вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз. В определенных вариантах осуществления он выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (AML), острого лимфобластного лейкоза (ALL), миелодисплазии, миелодиспластических синдромов, острого Т-лимфобластного лейкоза или острого промиелоцитарного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза или миелоидного бластного криза хронического миелоидного лейкоза.

**[0196]** В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предусмотрены способы лечения аутоиммунного воспалительного заболевания с применением белка, описанного в данном документе, и/или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. Способы можно применять для лечения различных аутоиммунных воспалительных заболеваний, ассоциированных с В-клетками, экспрессирующими BAFF-R, включая без ограничения рассеянный склероз, системную красную волчанку, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, ревматоидный артрит, воспалительное заболевание кишечника, сахарный диабет I типа, синдром Гийена-Барре, хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию, псориаз, миастению и васкулит.

### III. Фармацевтические композиции

[0197] В другом аспекте настоящей заявки предусмотрена комбинированная терапия. Белок, описанный в данном документе, можно применять в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами для лечения аутоиммунного заболевания или для лечения рака.

[0198] Иллюстративные терапевтические средства, которые можно применять в качестве составной части комбинированной терапии при лечении аутоиммунных воспалительных заболеваний, описаны в Li *et al.* (2017) *Front. Pharmacol.*, 8:460, и включают, например, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) (например, ингибиторы COX-2), глюкокортикоиды (например, преднизон/преднизолон, метилпреднизолон и фторированные глюкокортикоиды, такие как дексаметазон и бетаметазон), противоревматические лекарственные средства, модифицирующие заболевание (DMARD) (например, метотрексат, лефлуномид, соединения золота, сульфасалазин, азатиоприн, циклофосфамид, противомаларийные препараты, D-пеницилламин и циклоспорин), биологические препараты на основе антитела к TNF (например, инфликсимаб, этанерцепт, адалимумаб, голимумаб, цертолизумаб пегол и их биоаналоги) и другие биологические препараты, нацеливающиеся на CTLA-4 (например, абатацепт), рецептор IL-6 (например, тоцилизумаб), IL-1 (например, анакинра), Th1-клеточные иммунные ответы (IL-12/IL-23) (например, устекинумаб), Th17-клеточные иммунные ответы (IL-17) (например, секукинумаб) и CD20 (например, ритуксимаб).

[0199] Иллюстративные терапевтические средства, которые можно использовать в качестве составной части комбинированной терапии в лечении рака, включают, например, лучевую терапию, митомицин, третиноин, рибомустин, гемцитабин, винкристин, этопозид, кладрибин, митобронитол, метотрексат, доксорубицин, карбоксон, пентостатин, нитракрин, зиностатин, цетрореликс, летрозол, ралтитрексед, даунорубицин, фадрозол, фотемустин, тималфазин, собузоксан, недаплатин, цитарабин, бикалутамид, винорелбин, веснаринон, аминоклутетимид, амсакрин, проглумид, ацетат эллиптиния, кетансерин, доксифлуридин, этретинат, изотретиноин, стрептозоцин, нимустин, виндезин, флутамид, дрогенил, бутоцин, кармофур, разоксан, сизофилян, карбоплатин, митолактол, тегафур, ифосфамид, преднимустин, пицибанил, левамизол, тенипозид, импросульфан, эноцитабин, лизурид, оксиметолон, тамоксифен, прогестерон, мепитиостан, эпителиостанол, форместан, интерферон-альфа, интерферон-2

альфа, интерферон-бета, интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ), колониестимулирующий фактор-1, колониестимулирующий фактор-2, денилейкин дифтитокс, интерлейкин-2, рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона и варианты вышеупомянутых средств, которые могут проявлять дифференциальное связывание со своим когнатным рецептором или повышать или уменьшать период полужизни в сыворотке крови.

**[0200]** Дополнительным классом средств, которые можно применять в качестве составной части комбинированной терапии в лечении рака, являются ингибиторы контрольных точек иммунного ответа. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек иммунного ответа включают средства, которые ингибируют один или несколько из (i) цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного антигена 4 (CTLA4), (ii) белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD1), (iii) PDL 1, (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.

**[0201]** Еще одни средства, которые можно применять в качестве составной части комбинированной терапии в лечении рака, представляют собой средства на основе моноклональных антител, которые нацелены на мишени, не относящиеся к контрольным точкам иммунного ответа (например, герцептин), а также нецитотоксичные средства (например, ингибиторы тирозинкиназы).

**[0202]** Еще одни категории противораковых средств включают, например, (i) ингибитор, выбранный из ингибитора ALK, ингибитора ATR, антагониста A2A, ингибитора белков, участвующих в эксцизионной репарации оснований, ингибитора тирозинкиназы Vcr-Abl, ингибитора тирозинкиназы Брутона, ингибитора CDC7, ингибитора CHK1, ингибитора циклинзависимой киназы, ингибитора DNA-ПК, ингибитора, ингибирующего как DNA-ПК, так и mTOR, ингибитора DNMT1, ингибитора DNMT1 плюс 2-хлордезоксиаденозин, ингибитора HDAC, ингибитора компонентов сигнального пути Hedgehog, ингибитора IDO, ингибитора JAK, ингибитора mTOR, ингибитора MEK, ингибитора MELK, ингибитора MTH1, ингибитора PARP, ингибитора фосфоинозитид-3-киназы, ингибитора, ингибирующего как PARP1, так и DHODH, ингибитора протеасом, 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.

[0203] Белки по настоящему изобретению также можно применять в качестве дополнения к хирургическому удалению первичного очага.

[0204] Количество белка и дополнительного терапевтического средства, а также относительные временные рамки введения могут быть выбраны для достижения требуемого комбинированного терапевтического эффекта. Например, в случае введения средства комбинированной терапии пациенту, нуждающемуся в таком введении, терапевтические средства в комбинации или фармацевтическую композицию или композиции, содержащие терапевтические средства, можно вводить в любом порядке, таком как, например, последовательно, параллельно, совместно, одновременно и т. п. Дополнительно, например, белок можно вводить в то время, когда дополнительное(-ые) терапевтическое(-ие) средство(-а) проявляет(-ют) свой профилактический или терапевтический эффект, или наоборот.

#### IV. Фармацевтические композиции

[0205] В настоящем изобретении также представлены фармацевтические композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество белка, описанного в данном документе. Композиция может быть составлена для применения в различных системах доставки лекарственных средств. В композицию для надлежащего составления также может быть включено одно или несколько физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. Подходящие составы для применения в настоящем изобретении можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см., например, в Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[0206] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен состав на основе белка, который содержит BAFF-R-связывающий участок, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0207] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:40, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:41. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:42, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:43. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:54, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:55. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:56, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:57. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:59, и переменным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:59. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с переменным доменом тяжелой

цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:60, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:79. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:77, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:64, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:65, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:66, и варибельным доменом

легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:67, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:68, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:69, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:70, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах

осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:71, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:72, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:73, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:74, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:75, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63. В определенных вариантах осуществления состав содержит белок, который содержит антигенсвязывающий участок с варибельным доменом тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:76, и варибельным доменом легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичную аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:63.

**[0208]** Композиция может быть составлена для применения в различных системах доставки лекарственных средств. В композицию для надлежащего составления может быть включено одно или несколько физиологически приемлемых вспомогательных веществ или носителей. Подходящие составы для применения в настоящем изобретении можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985. Краткий обзор способов доставки лекарственных средств см., например, в Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

**[0209]** Например, настоящее изобретение может существовать в виде водного фармацевтического состава, содержащего терапевтически эффективное количество белка в забуференном растворе, образующем состав. Водные носители могут включать стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), забуференный раствор для поддержания pH (например, забуференный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В определенных вариантах осуществления получают водный состав, содержащий белок, раскрытый в данном документе, в забуференном растворе для поддержания pH. Значения pH препаратов, как правило, будут составлять 3-11, более предпочтительно 5-9 или 6-8 и наиболее предпочтительно 7-8, как например 7-7,5. Предполагается, что диапазоны, промежуточные по отношению к вышеприведенным значениям pH, также являются частью настоящего изобретения. Например, предполагается, что включены диапазоны значений, в которых используется комбинация любых из вышеприведенных значений в качестве верхнего и/или нижнего

пределов. Примеры буферов, которые будут обеспечивать контроль pH в пределах данного диапазона, включают ацетатный (например, ацетат натрия), сукцинатный (такой как сукцинат натрия), глюконатный, гистидиновый, цитратный и другие буферы на основе органических кислот. В определенных вариантах осуществления буферная система включает моногидрат лимонной кислоты, цитрат натрия, дигидрат динатрийфосфата и/или дигидрат дигидрофосфата натрия. В определенных вариантах осуществления буферная система содержит приблизительно 1,3 мг/мл лимонной кислоты (например, 1,305 мг/мл), приблизительно 0,3 мг/мл цитрата натрия (например, 0,305 мг/мл), приблизительно 1,5 мг/мл дигидрата фосфата динатрия (например, 1,53 мг/мл), приблизительно 0,9 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия (например, 0,86) и приблизительно 6,2 мг/мл хлорида натрия (например, 6,165 мг/мл). В определенных вариантах осуществления буферная система содержит 1-1,5 мг/мл лимонной кислоты, от 0,25 до 0,5 мг/мл цитрата натрия, от 1,25 до 1,75 мг/мл дигидрата фосфата динатрия, от 0,7 до 1,1 мг/мл дигидрата дигидрофосфата натрия и от 6,0 до 6,4 мг/мл хлорида натрия. Значение pH жидкого состава можно установить посредством добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может являться хлористоводородная кислота. В определенных вариантах осуществления основание может представлять собой гидроксид натрия.

**[0210]** В некоторых вариантах осуществления состав включает водный носитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применим для получения жидкого состава. Иллюстративные носители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), забуференный раствор для поддержания pH (например, забуференный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы.

**[0211]** В состав также может быть включен полиол, который действует как регулятор тоничности и может стабилизировать антитело. Полиол добавляют в состав в количестве, которое может варьироваться в зависимости от требуемой изотоничности состава. В определенных вариантах осуществления водный состав может быть изотоническим. Количество добавляемого полиола также может изменяться в зависимости от молекулярной массы полиола. Например, может быть добавлено меньшее количество моносахарида (например, маннита) по сравнению с дисахаридом

(таким как трегалоза). В определенных вариантах осуществления полиол, который можно применять в составе в качестве средства, регулирующего тоничность, представляет собой маннит. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 7,5 до приблизительно 15 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять от приблизительно 10 до приблизительно 14 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация маннита может составлять приблизительно 12 мг/мл. В определенных вариантах осуществления в состав может быть включен полиол, представляющий собой сорбит.

**[0212]** В состав также могут быть добавлены детергент или поверхностно-активное вещество. Иллюстративные детергенты включают неионогенные детергенты, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20, 80 и т. д.) или полоксамеры (например, полоксамер 188). Количество добавляемого детергента является таким, что он уменьшает агрегацию составленного антитела, и/или сводит к минимуму образование частиц в составе, и/или уменьшает адсорбцию. В определенных вариантах осуществления состав может содержать поверхностно-активное вещество, которое представляет собой полисорбат. В определенных вариантах осуществления состав может содержать детергент полисорбат 80 или Tween 80. Tween 80 представляет собой термин, используемый для описания полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеата (см. Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th edi., 1996). В определенных вариантах осуществления состав может содержать полисорбат 80 в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 10 мг/мл или от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл. В определенных вариантах осуществления в состав может быть добавлено приблизительно 0,1% полисорбата 80.

**[0213]** В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может быть получен в виде раствора с концентрацией 10 мг/мл в комбинации с сахаром при стабилизирующих уровнях. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может быть получен в водном носителе. В определенных вариантах осуществления стабилизатор может быть добавлен в количестве, не превышающем количество, которое может приводить к вязкости, нежелательной или не подходящей для внутривенного введения. В определенных вариантах осуществления сахар может представлять собой дисахариды, например,

сахарозу. В определенных вариантах осуществления жидкий состав может также содержать одно или несколько буферных средств, поверхностно-активное вещество и консервант, которые в данном документе добавляют в составы для снижения бактериальной активности. Добавление консерванта, например, может содействовать получению состава для многоразового (многодозового) применения.

**[0214]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен состав с увеличенным сроком хранения, содержащий белок по настоящему изобретению в комбинации с маннитом, моногидратом лимонной кислоты, цитратом натрия, дигидратом фосфата динатрия, дигидратом дигидрофосфата натрия, хлоридом натрия, полисорбатом 80, водой и гидроксидом натрия.

**[0215]** Дезамидирование приводит к образованию распространенного варианта продукта на основе пептидов и белков, которое может происходить в ходе ферментации, сбора/осветления клеток, очистки, хранения лекарственного вещества/лекарственного продукта и в ходе анализа образцов. Дезамидирование представляет собой потерю  $\text{NH}_3$  из белка с образованием сукцинимидного промежуточного соединения, которое может подвергаться гидролизу. Сукцинимидное промежуточное соединение приводит к уменьшению массы исходного пептида на 17 дальтон. Последующий гидролиз приводит к увеличению массы на 18 дальтон. Выделение сукцинимидного промежуточного соединения затруднено ввиду его нестабильности в водных условиях. Таким образом, дезамидирование, как правило, можно обнаружить по увеличению массы на 1 дальтон. Дезамидирование аспарагина приводит к образованию либо аспарагиновой, либо изоаспарагиновой кислоты. Параметры, влияющие на скорость дезамидирования, включают pH, температуру, диэлектрическую константу растворителя, ионную силу, первичную последовательность, локальную конформацию полипептида и третичную структуру. Аминокислотные остатки, смежные с Asn в пептидной цепи, влияют на значения скорости дезамидирования. Gly и Ser, следующие за Asn в белковых последовательностях, приводят к более высокой восприимчивости к дезамидированию. В определенных вариантах осуществления жидкий состав по настоящему изобретению может храниться в условиях pH и влажности, обеспечивающих предупреждение дезаминирования белкового продукта.

**[0216]** В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой лиофилизированный состав. В определенных вариантах осуществления состав является

сублимированным (лиофилизированным) и содержится в приблизительно 12-60 флаконах. В определенных вариантах осуществления состав является сублимированным, и в одном флаконе может содержаться 45 мг сублимированного состава. В определенных вариантах осуществления в одном флаконе содержится от приблизительно 40 мг до приблизительно 100 мг сублимированного состава. В определенных вариантах осуществления сублимированный состав из 12, 27 или 45 флаконов объединяют с получением терапевтической дозы белка в составе на основе лекарственного средства для внутривенного введения. Состав может представлять собой жидкий состав. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав хранится в количестве, составляющем от приблизительно 250 мг/флакон до приблизительно 1000 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления жидкий состав хранится в количестве, составляющем приблизительно 600 мг/флакон. В определенных вариантах осуществления жидкий состав хранится в количестве, составляющем приблизительно 250 мг/флакон.

**[0217]** В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав содержит белки, описанные в данном документе, и лиопротектор. Лиопротектор может представлять собой сахар, например, дисахариды. В определенных вариантах осуществления лиопротектор может представлять собой сахарозу или мальтозу. Лиофилизированный состав может также содержать одно или несколько из буферного средства, поверхностно-активного вещества, объемобразующего средства и/или консерванта. Количество сахарозы или мальтозы, применимое для стабилизации лиофилизированного лекарственного продукта, может быть представлено при весовом соотношении белка и сахарозы или мальтозы, составляющем по меньшей мере 1:2. В определенных вариантах осуществления весовое соотношение белка и сахарозы или мальтозы может составлять от 1:2 до 1:5.

**[0218]** В определенных вариантах осуществления значение pH состава перед лиофилизацией можно установить посредством добавления фармацевтически приемлемой кислоты и/или основания. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемой кислотой может являться хлористоводородная кислота. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемым основанием может являться гидроксид натрия. Перед лиофилизацией значение pH раствора, содержащего белок по настоящему изобретению, может быть доведено до 6-8. В

определенных вариантах осуществления диапазон рН лиофилизированного лекарственного продукта может составлять 7-8.

**[0219]** В определенных вариантах осуществления может быть добавлено “объемообразующее средство”. “Объемообразующее средство” представляет собой соединение, которое увеличивает массу лиофилизированной смеси и вносит вклад в физическую структуру лиофилизированной таблетки (например, содействует получению по существу однородной лиофилизированной таблетки, которая сохраняет структуру с открытыми порами). Иллюстративные объемообразующие средства включают маннит, глицин, полиэтиленгликоль и сорбит. Лиофилизированные составы по настоящему изобретению могут содержать такие объемообразующие средства.

**[0220]** В определенных вариантах осуществления лиофилизированный продукт на основе белка составлен с водным носителем. Предусмотренный в данном документе водный носитель, представляющий интерес, представляет собой водный носитель, который является фармацевтически приемлемым (например, безопасным и нетоксичным для введения человеку) и применим для приготовления жидкого состава после лиофилизации. Иллюстративные растворители включают стерильную воду для инъекций (SWFI), бактериостатическую воду для инъекций (BWFI), забуференный раствор для поддержания рН (например, забуференный фосфатом солевой раствор), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. В определенных вариантах осуществления лиофилизированный лекарственный продукт по настоящему изобретению восстанавливают с помощью либо стерильной воды для инъекций, USP (SWFI), либо 0,9% раствора хлорида натрия для инъекций, USP. В ходе восстановления лиофилизированный порошок растворяется в растворе. В определенных вариантах осуществления лиофилизированный белковый продукт по настоящему изобретению восстанавливают водой для инъекций до приблизительно 4,5 мл и разбавляют 0,9% солевым раствором (раствором хлорида натрия).

**[0221]** Композиции на основе белка можно стерилизовать с помощью общепринятых методик стерилизации или можно подвергать стерилизующей фильтрации. Полученные водные растворы можно упаковать для применения в исходном виде или лиофилизировать, при этом перед введением лиофилизированный препарат объединяют со стерильным водным носителем. Полученные композиции в твердой форме можно упаковать в несколько емкостей с однократной дозой, каждая из которых содержит фиксированное количество вышеупомянутых средства или средств.

Композиция в твердой форме также может быть упакована в контейнер для введения изменяемого количества.

**[0222]** Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать для получения количества активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без проявления токсичности в отношении пациента.

**[0223]** Конкретная доза может представлять собой одинаковую дозу для каждого пациента, например 50-5000 мг белка. В качестве альтернативы доза для пациента может быть рассчитана с учетом примерного веса тела или площади поверхности тела пациента. Другие факторы при определении подходящей дозы могут включать заболевание или состояние, подлежащее лечению или предупреждению, тяжесть заболевания, путь введения, а также возраст, пол пациента и его состояние с медицинской точки зрения. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения подходящей дозы для лечения, рутинно выполняется специалистами в данной области техники, особенно в свете информации относительно дозы и анализов, раскрытых в данном документе. Доза также может быть определена посредством применения известных анализов для определения доз, применяемых в сочетании с соответствующими данными относительно зависимости ответа от дозы.

Индивидуальная доза для пациента может быть скорректирована в ходе наблюдения за течением заболевания. Уровни способных к нацеливанию конструкции или комплекса в крови пациента могут быть измерены, чтобы определить, имеется ли необходимость в корректировке дозы для достижения или поддержания эффективной концентрации.

Фармакогеномику можно использовать для определения того, какие способные к нацеливанию конструкции и/или комплексы и их дозировки наиболее вероятно будут эффективны для данного индивидуума (Schmitz *et al.*, *Clinica. Chimica. Acta.* 308: 43-53, 2001; Steimer *et al.*, *Clinica. Chimica. Acta.* 308: 33-41, 2001).

**[0224]** В целом, дозы, основанные на весе тела, составляют от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мг на кг веса тела, как например от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно

0,01 мкг до приблизительно 50 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 10 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 1 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,01 мкг до приблизительно 0,1 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 10 мкг/кг веса тела, от приблизительно 0,1 мкг до приблизительно 1 мкг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 50 мкг/кг веса тела, от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мкг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 10 мкг до приблизительно 50 мкг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 100 мкг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 100 мкг до приблизительно 1 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг/кг веса тела, от приблизительно 10 мг до приблизительно 50 мг/кг веса тела, от приблизительно 50 мг до приблизительно 100 мг/кг веса тела. Дозы можно вводить один или несколько раз в день, еженедельно, ежемесячно или ежегодно или даже один раз в 2-20 лет.

Специалисты в данной области техники могут легко оценить частоту повторного

введения дозы на основе измеренных значений времени удержания и концентраций способных к нацеливанию конструкции или комплекса в физиологических жидкостях или тканях организма. Введение по настоящему изобретению могло быть внутривенным, внутриартериальным, внутрибрюшинным, внутримышечным, подкожным, интраплевральным, интратекальным, внутрисполостным, посредством перфузии с помощью катетера или посредством прямой внутриочаговой инъекции. Его можно осуществлять один или несколько раз в день, один или несколько раз в неделю, один или несколько раз в месяц и один или несколько раз в год.

**[0225]** В приведенном выше описании описаны многочисленные аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения. В настоящей патентной заявке конкретно предусматриваются все комбинации аспектов и вариантов осуществления, а также изменения их порядка.

**[0226]** На протяжении всего описания, когда композиции описываются как имеющие, включающие или содержащие конкретные компоненты, или когда процессы и способы описываются как имеющие, включающие или предусматривающие конкретные стадии, предполагается, что дополнительно предусматриваются композиции по настоящему изобретению, которые состоят по существу из или состоят из перечисленных компонентов, а также что предусматриваются процессы и способы в соответствии настоящим изобретением, которые состоят по существу или состоят из указанных стадий обработки.

**[0227]** В настоящей заявке, если указано, что элемент или компонент включен в перечень перечисленных элементов или компонентов или выбран из него, следует понимать, что элемент или компонент может представлять собой любой из перечисленных элементов или компонентов, или элемент или компонент может быть выбран из группы, состоящей из двух или более перечисленных элементов или компонентов.

**[0228]** Дополнительно следует понимать, что элементы и/или признаки композиции или способа, описанных в данном документе, можно комбинировать различными путями без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, явно или неявно описанных в данном документе. Например, если приводится ссылка на конкретное соединение, то данное соединение можно использовать в различных вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению и/или в способах по настоящему изобретению, если иное не следует из контекста. Другими словами, в

пределах данной заявки варианты осуществления были описаны и изображены таким образом, чтобы можно было написать и изобразить четкую и краткую заявку, но предполагается и будет понятно, что варианты осуществления можно различным образом комбинировать или разделять без отрыва от идей настоящего(-их) изобретения(-ий). Например, будет понятно, что все признаки, описанные и изображенные в данном документе, можно применять ко всем аспектам настоящего(-их) изобретения(-ий), описанным и изображенным в данном документе.

**[0229]** Следует понимать, что выражение “по меньшей мере один из” включает отдельно каждый из объектов, перечисленных после выражения, и различные комбинации двух или более из перечисленных объектов, если иное не следует из контекста и применения. Выражение “и/или” в сочетании с тремя или более перечисленными объектами следует понимать как имеющее то же значение, если иное не следует из контекста.

**[0230]** Применение термина “включать”, “включает”, “включая”, “иметь”, “имеет”, “имеющий”, “содержать”, “содержит” или “содержащий”, включая их грамматические эквиваленты, в целом следует понимать как открытое и неограничивающее, например, не исключающее дополнительные неперечисленные элементы или стадии, если иное специально не указано или не понятно из контекста.

**[0231]** Если термин “приблизительно” используется перед количественным значением, то настоящее изобретение также включает конкретное количественное значение как таковое, если специально не указано иное. Используемый в данном документе термин “приблизительно” относится к отклонению  $\pm 10\%$  от номинального значения, если не указано или не предполагается иное.

**[0232]** Следует понимать, что порядок стадий или порядок выполнения определенных действий не имеет значения до тех пор, пока настоящее изобретение остается осуществимым. Более того, две или более стадий или действий можно выполнять одновременно.

**[0233]** Применение любых и всех примеров или иллюстративной формулировки в данном документе, например, “такой как” или “включая”, предназначено исключительно для того, чтобы лучше проиллюстрировать настоящее изобретение и не налагает ограничения на объем настоящего изобретения, если это не заявлено. Никакую формулировку в настоящем описании не следует толковать как указывающую

на какой-либо незаявленный элемент в качестве существенного для практического осуществления настоящего изобретения.

### ПРИМЕРЫ

**[0234]** Настоящее изобретение, которое в данной работе описано в общих чертах, будет легче понять при обращении к следующим примерам, которые включены исключительно в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения каким-либо образом объема настоящего изобретения.

#### **Пример 1. Получение и определение характеристик mAb, связывающих BAFF-R.**

**[0235]** В данном примере описаны две кампании по обнаружению антител, проведенные для идентификации молекул, связывающих BAFF-R. Одну связывающую молекулу выбирали для дополнительной разработки с применением технологии дрожжевого дисплея, нескольких циклов созревания аффинности (сфокусированных на CDRH3 и сфокусированных на CDRH1/CDRH2), коррекции потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности, оптимизации путем давления на скорость диссоциации и сайт-направленного мутагенеза для улучшения биологических свойств. В этих исследованиях идентифицировали молекулу, связывающую AB1612/AB1424, как связывающую молекулу, проявляющую свойства, подходящие для кандидата в биологические лекарственные средства и, что важно, проявляющее способность ингибировать взаимодействие BAFF-R-BAFF (показано на **фиг. 1**).

#### ***Способы иммунизации рекомбинантными белками***

**[0236]** Антитела, специфические в отношении BAFF-R, получали путем иммунизации четырех различных линий мышей (H2L2, NZBW, BALB-C и SJL/J) слитым белком hBAFF-R-hFc-His. На основе титров антисыворотки отобрали в общей сложности семь мышей из четырех различных линий для получения гибридного слияния. Спленоциты из подгруппы мышей из каждой группы иммунизации сохраняли для создания иммунной библиотеки; однако для обнаружения mAb на дрожжевом дисплее использовали только спленоциты от мышей H2L2.

**[0237]** Из пяти слияний с клетками мышей (спленоциты от двух мышей объединяли для слияния H2L2 и спленоциты от двух мышей объединяли для слияния SJL/J) по шестнадцать 96-луночных планшетов на гибридное слияние анализировали с

помощью ELISA для определения специфичности, в котором сравнивали связывание с BAFF-R-hFc-His человека и яванского макака и связывание с нерелевантным белком-hFc-His. Надосадочные жидкости из 33 положительных и специфических в отношении BAFF-R гибридом отбирали для дальнейшего анализа. Надосадочные жидкости тестировали в отношении связывания с изогенными BAFF-R+ клетками CHO и дополнительно субклонировали 16 положительных гибридом. Надосадочные жидкости от субклонов анализировали с помощью ELISA для определения специфичности, как описано выше, и 20 положительных и специфических в отношении BAFF-R субклонов тестировали в отношении связывания с BAFF-R+ клетками. Девять субклонов mAb продемонстрировали сильное связывание с BAFF-R+ клетками и их секвенировали. Получили шесть уникальных последовательностей, а соответствующие mAb дополнительно анализировали в отношении их способности блокировать взаимодействия BAFF-R-BAFF в клеточном анализе.

**[0238]** Связывание биотинилированного BAFF с BAFF-R+ клетками CHO тестировали в отсутствие или в присутствии шести mAb, специфических в отношении BAFF-R, или изотипических контрольных mAb. Снижение средней интенсивности флуоресценции (MFI) в присутствии антитела означало, что mAb ингибирует взаимодействие при связывании BAFF с BAFF-R, вследствие этого его обозначали как блокирующее антитело. Все протестированные клоны не ингибировали связывание BAFF с BAFF-R+ клетками, и следовательно все шесть назвали неблокирующими (фиг. 2).

### *Способы ДНК-иммунизации*

**[0239]** Осуществляли ДНК-иммунизацию каждой из двух групп мышей SWR/J. Одну группу иммунизировали с помощью кДНК-конструкции полноразмерного BAFF-R человека, а другую – с помощью смеси кДНК-конструкций полноразмерного BAFF-R человека и внеклеточного домена BAFF-R человека. На основе титров антисывороток мышей объединяли и впоследствии отбирали для сортировки отдельных В-клеток и другого пула, используемого для получения гибридомного слияния.

**[0240]** Мероприятия по сортировке отдельных В-клеток давали 44 клон, перекрестно-реактивных в отношении молекулы человека и яванского макака. Эти клоны секвенировали, временно экспрессировали в 293 клетках, а специфичность очищенного mAb анализировали посредством проточной цитометрии, в которой сравнивали связывание с hBAFF-R<sup>+</sup>, супоBAFF-R<sup>+</sup> изогенными клетками CHO и с

исходной линией клеток. Восемь связывающих молекул очищали и дополнительно анализировали в отношении их способности связываться с BAFF-R и блокировать взаимодействия BAFF-R-BAFF. Определили, что все восемь клонов были неблокирующими и демонстрировали слабую аффинность к hBAFF-R<sup>+</sup> раковым клеткам.

[0241] Специфичность клонов, полученных с помощью традиционного гибридного подхода, анализировали посредством проточной цитометрии. Проводили следующую оценку: а) связывание с клетками, экспрессирующими или полноразмерный BAFF-R человека, или внеклеточный домен BAFF-R человека, сравнивали со связыванием с нетрансфицированными исходными клетками; б) связывание с hBAFF-R<sup>+</sup> и супоBAFF-R<sup>+</sup> изогенными клетками сравнивали со связыванием с исходными клетками; в) связывание с hBAFF-R<sup>+</sup> раковыми клетками. Идентифицировали 25 положительных гибридных слияний и на основе интенсивности связывания секвенировали 14 слитых гибридом. Получили пять уникальных последовательностей и анализировали в отношении их способности связывать BAFF-R<sup>+</sup> клетки и блокировать взаимодействия BAFF-R-BAFF. Хотя все пять клонов определяли как неблокирующие клоны (фиг. 3А-3Д), четыре из пяти клонов (клоны 3А1, 1В3-А7, 7G4 и 10Н7-С5) демонстрировали хорошую аффинность в отношении hBAFF-R.

*scFv, специфические в отношении BAFF-R, обнаруженные в дрожжевых библиотеках*

[0242] Дрожжевой дисплей использовали для построения библиотек scFv из спленоцитов, полученных от гуманизированных мышей H2L2, иммунизированных рекомбинантным белком hBAFF-R-hFc-His человека, описанным выше. Проводили три цикла селекции с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His при 5 нМ. Отдельные колонии дрожжей собирали, секвенировали и последовательности анализировали. Проводили отрицательный отбор для удаления неспецифических связывающих молекул. Конвергенция последовательностей указала на то, что процесс отбора был успешным с точки зрения обогащения связывающими молекулами и, следовательно, завершен. Для дополнительного определения характеристик отбирали уникальные последовательности. В одной библиотеке обнаружили три scFv, специфические в отношении BAFF-R (таблица 4). Однако эти последовательности были очень

сходными, и, следовательно, для дальнейшего исследования отобрали только последовательность 1129\_A01 (также называемый AB0369scFv).

**Таблица 4.** Последовательности CDR связывающих BAFF-R молекул, обнаруженных в дрожжевой библиотеке

<b>ID клона</b>	<b>CDRH 1</b>	<b>CDRH2</b>	<b>CDRH3</b>	<b>CDRL1</b>	<b>CDRL2</b>	<b>CDRL3</b>
1129_A 01 (scFv AB0369 )	GFTFS SY (SEQ ID NO:1)	WYDG SN (SEQ ID NO:2)	RFTMLRGLIIEDYG MDV (SEQ ID NO:3)	RASQSISSY LN (SEQ ID NO:4)	AASSL QS (SEQ ID NO:5)	QQSYSTP LT (SEQ ID NO:6)
1203_A 01	GFTFS SY (SEQ ID NO:1)	WYDG SN (SEQ ID NO:2)	RFTMLRGVFIEDY GMDV (SEQ ID NO:7)	RASQSVSS NLA (SEQ ID NO:8)	GASTR AT (SEQ ID NO:9)	QQSYSTP LT (SEQ ID NO:6)
1203_A 02	GFTFS TY (SEQ ID NO:10)	WYDG SN (SEQ ID NO:2)	RNTMVRGVIIEDY GMDV (SEQ ID NO:11)	RASQSISSY LN (SEQ ID NO:4)	AASSL QS (SEQ ID NO:5)	QQSYSSP LT (SEQ ID NO:12)

**[0243]** Проточную цитометрию использовали для оценки специфичности связывания AB0369scFv с hBAFF-R-hFc-His, hBAFF-R-GST-His и белками отрицательного контроля с меткой hFc или меткой GST в то время, когда они отображены на поверхности дрожжей. AB0369scFv продемонстрировал от средней до слабой аффинности к hBAFF-R; однако он не показал связывание с отрицательным контролем, что позволяет предположить, таким образом, высокую специфичность в отношении BAFF-R (**фиг. 4A-4E**).

**[0244]** 1129\_A01 (scFv AB0369) превращали в мультиспецифический связывающий белок, содержащий scFv и две отличные от связывающих BAFF-R молекулы с

получением АВ0369. АВ0369 дополнительно анализировали в отношении его способности связываться с ВАFF-R<sup>+</sup> клетками с молекулой человека (hBAFF-R-CHO) (фиг. 5А) и ВАFF-R<sup>+</sup> клетками с молекулой яванского макака (сBAFF-R-CHO) (фиг. 5В), отсутствия неспецифических взаимодействий по результатам анализа с использованием реагента для определения полиспецифичности (фиг. 6А, фиг. 6В), лизировать раковые ВАFF-R<sup>+</sup> клетки Ramos (фиг. 7 и таблица 5) и блокировать взаимодействия ВАFF-ВАFF-R (фиг. 8). АВ0369 связывалось с ВАFF-R как человека, так и яванского макака на поверхности изогенных клеток CHO, а связывание ВАFF-R осуществлялось с EC<sub>50</sub>, приблизительно 10 нМ, что делает его хорошим выбором для дальнейшей разработки.

**Таблица 5.** Эффективность АВ0369 в анализе цитотоксичности KHYG-1-CD16aV

Молекула	EC <sub>50</sub> (нМ)	Макс. лизис (%)
АВ0369-001	0,6	73

**[0245]** Способность АВ0369 блокировать взаимодействия ВАFF-R-ВАFF тестировали в клеточном анализе блокирования. Вкратце, клетки CHO, экспрессирующие ВАFF-R человека, собирали, промывали холодным буфером для FACS и высевали с плотностью 100000 клеток на лунку. Тестируемые образцы разбавляли в буфере для FACS и к клеткам добавляли по 50 мкл разбавленного мультиспецифического связывающего белка или mAb, инкубировали на льду в течение 60 минут, затем промывали буфером для FACS. 12 нМ ВАFF-биотин разбавляли в буфере для FACS и добавляли по 100 мкл на лунку, инкубировали в течение 60 минут на льду, затем промывали буфером для FACS. Клетки инкубировали со 100 мкл стрептавидина-PE 1:200, разбавленного в буфере FACS, и инкубировали на льду в течение 30 минут, затем промывали буфером для FACS. Затем клетки инкубировали в 100 мкл красителя для живых/мертвых клеток, разбавленном в PBS в соотношении 1:1000, в течение 15 минут, затем промывали с помощью буфера для FACS и фиксировали. После инкубации клетки промывали буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS для анализа с помощью проточной цитометрии. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) каждого образца и контроля, представляющего собой только вторичное антитело. Максимальную MFI рассчитывали как ВАFF-биотин отдельно, а минимальную MFI рассчитывали как стрептавидин-фикоэритрин отдельно. Данные аппроксимировали до

четырёхпараметрической кривой нелинейной регрессии с использованием GraphPad Prism.

[0246] Эти исследования выявили, что АВ0369 способно частично блокировать взаимодействия BAFF-R-BAFF. Однако блокирование было значительно менее сильным, чем сравнительный контроль на основе ианалумаба, который не содержит мутаций, усиливающих антителозависимую клеточную цитотоксичность, в отличие от исходного антитела, предположительно вследствие низкой аффинности АВ0369 (фиг. 8 и таблица 6). Поскольку АВ0369 scFv было единственным блокирующим антителом, идентифицированным в результате всех описанных выше мероприятий, то его подвергали дополнительной разработке путем созревания аффинности CDRH3 и CDRH1/CDRH2, а также дополнительных аминокислотных изменений для облегчения получения и стабильности белка.

**Таблица 6.** Краткое описание АВ0369 и сравнительного моноклонального антитела, блокирующего связывание BAFF с клеточным BAFF-R

Молекула	IC <sub>50</sub> (нМ)	Минимальная (MFI)
АВ0369-001	488	38,180
Экспериментальное mAb на основе ианалумаба	0,5	224
Человеческий IgG1k	N/A	68,050

### ***Созревание аффинности АВ0369***

*Рандомизированное созревание аффинности, сфокусированное на CDRH3*

[0247] Как описано выше, АВ0369 продемонстрировало специфическое связывание с клетками, экспрессирующими BAFF-R. Для поиска вариантов с улучшенной аффинностью связывания создавали библиотеку созревания аффинности на дрожжевом дисплее путем мутирования остатка CDRH3 (RFTMLRGLIEDYGMDV (SEQ ID NO:3) из АВ0369. Для обогащения scFv, которые характеризуются более высокой аффинностью в отношении hBAFF-R, осуществляли два цикла отбора с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His при концентрации 1 нМ (фиг. 9А-9D). Сравнивали значения аффинности между исходным клоном АВ0369 и типичными отдельными клонами из библиотеки. Три цикла сортировки с помощью FACS привели к получению девяти клонов, которые содержали одно или два аминокислотных различия по сравнению с исходным клоном (RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID

NO:14); RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:13); RFTMLRGWPIEDYGMDV (SEQ ID NO:15)) и проявляли более высокую аффинность связывания с hBAFF-R, чем исходный клон, и scFv, полученный из исходного антитела с использованием scFv на основе ианалумаба, используемый в качестве сравнительного контроля (фиг. 10А-10Е).

[0248] scFv с самой высокой аффинностью связывания hBAFF-R превращали в мультиспецифические связывающие белки, содержащие scFv и две отличные от связывающих BAFF-R молекулы, экспрессировали в клетках Expi293 и дополнительно анализировали в отношении их способности связываться с клетками, экспрессирующими BAFF-R (фиг. 11А), и способности лизировать раковые клетки Ramos, экспрессирующие BAFF-R (фиг. 11В, фиг. 11С). Все мультиспецифические связывающие белки были отрицательными в анализе полиспецифичности, что позволяет предположить, что повышенная аффинность связывания была специфической в отношении BAFF-R (фиг. 12А-12В). Дополнительные исследования продемонстрировали улучшение связывания BAFF-R более чем в три раза, что приводило к улучшению эффективности в шесть-десять раз, как измерено по EC<sub>50</sub> (таблица 7). Максимальный лизис оставался не измененным, что позволяет предположить, что улучшение аффинности связывания BAFF-R было ключевым фактором этого улучшения эффективности.

**Таблица 7.** Краткое описание связывания клеток и цитолиза, демонстрируемых с помощью мультиспецифических связывающих белков на основе вариантов HCDR3 с созревшей аффинностью по сравнению с исходным АВ0369.

Молекула	Связывание клеток BAFF-R-СНО, EC <sub>50</sub> (нМ)	Цитолиз клеток Ramos, опосредованный КНУГ- А-CD16aV, EC <sub>50</sub> (нМ)
AB0605-001	5,72	0,15
AB0606-001	4,50	0,06
AB0622-001	3,45	0,09
AB0369-001	>10	0,64

*Комбинаторное созревание аффинности, сфокусированное на CDRH1 и CDRH2*

[0249] Результаты исследований созревания аффинности, сфокусированного на CDRH3, продемонстрировали улучшение аффинности, и дополнительное улучшение

было весьма желательным. Таким образом, для созревания аффинности отбирали последовательности CDRH1 и CDRH2 (CDRH1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1) и CDRH2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)) с использованием зрелого остова CDRH3. Цель заключалась в разработке и отборе связывающих молекул с улучшенной аффинностью по сравнению с исходным клоном (scFv AB0369) или CDRH3-оптимизированными вариантами, описанными выше. При этом создали библиотеку с рандомизированными CDRH1 и CDRH2 с сохранением оптимизированной CDRH3. Проводили два цикла FACS для обогащения связывающими молекулами с высокой аффинностью (**фиг. 13A-13C**).

**[0250]** После FACS идентифицировали 24 клон. Наблюдали, что несколько клонов с изменениями в CDRH1 (RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO: 14); RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:13); RFTMLRGWIIEDYGMDV (SEQ ID NO:15)) на оптимизированном остове CDRH3 показала значительное улучшение аффинности к hBAFF-R по сравнению с исходным AB0369scFv (1129\_A01) (**фиг. 14A-14D**) или сравнительным контрольным scFv на основе ианалумаба (**фиг. 14E**).

**[0251]** scFv с самыми высокими значениями аффинности связывания с hBAFF-R превращали в мультиспецифические связывающие белки, содержащие scFv и две отличные от связывающих BAFF-R молекулы, экспрессировали в клетках Expi293 и дополнительно анализировали в отношении их способности связываться с клетками, экспрессирующими BAFF-R человека (**фиг. 15A**), связываться с BAFF-R<sup>+</sup> клетками с молекулами яванского макака (**фиг. 15B**) и ингибировать взаимодействия BAFF-R-BAFF (**фиг. 15C** и **таблица 8**). Протестированные мультиспецифические связывающие белки показали улучшение по всем трем критериям и продемонстрировали эффективное уничтожение BAFF-R<sup>+</sup> клеток ВJAB в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16a (**фиг. 16, таблица 9**).

**Таблица 8.** Краткое описание связывания клеток с BAFF-R и блокирования BAFF-R-BAFF, продемонстрированного мультиспецифическими связывающими белками на основе созревания аффинности CDRH1 и CDRH2

Молекула	Связывание клеток с BAFF-R человека, EC <sub>50</sub> (нМ)	Связывание клеток с BAFF-R яванского макака, EC <sub>50</sub> (нМ)	Блокирование BAFF-BAFF-R, IC <sub>50</sub> (нМ)
AB0682-001	2,4	3,1	12,6
AB0681-001	5,1	5,6	-
AB0679-001	2,3	2,6	9,4
AB0369-001	>10	>15	-
Экспериментальное F3'	4,3	2,9	-
Экспериментальное mAb	-	-	0,38

**Таблица 9.** Эффективность типичных мультиспецифических связывающих белков на основе созревания аффинности CDRH1 и CDRH2 в анализе цитолиза KHYG-1-CD16V

Молекула	EC <sub>50</sub> (нМ)	Макс. лизис (%)
AB0679-001	0,11	83
AB0682-001	0,09	79
Экспериментальное F3'	0,61	69

*Устранение потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности*

**[0252]** Поскольку клоны с созревшей аффинностью содержали в своих CDR аминокислоты, которые могли отрицательно влиять на экспрессию, стабильность или иммуногенность белка, то создавали дополнительные библиотеки для отбора клонов без этих аминокислот. Проводили три цикла отбора с помощью 1 нМ биотинилированного белка hBAFF-R-hFc-His, что приводило к обогащению

связывающими молекулами с высокой аффинностью (**фиг. 17A–17D**). Всего идентифицировали 23 связывающих молекулы, 12 из которых согласно прогнозам не содержали нежелательных аминокислот (“откорректированных по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций”).

**[0253]** Предпочтительные клоны, не содержащие потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательностях из этих библиотек, включали АВ0898 (описанная выше версия АВ0682, откорректированная по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций), АВ0899 и АВ0900, которые успешно идентифицировали и тестировали в отношении их связывания с hBAFF-R, когда они отображены на дрожжах. Все клоны продемонстрировали более высокую аффинность в отношении hBAFF-R по сравнению с исходным АВ0369scFv (**фиг. 18A–18F**).

*Определение характеристик мультиспецифических связывающих белков, откорректированных по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций*

**[0254]** Три из откорректированных по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций клонов превращали в мультиспецифические связывающие белки, содержащие scFv и две отличные от связывающих BAFF-R молекулы, экспрессировали в клетках Expi293, очищали с помощью двухстадийного процесса очистки и характеризовали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), связывания с клетками, экспрессирующими BAFF-R, и способности лизировать клетки VJAB в анализе цитотоксичности, опосредованном KHYG-1-CD16aV. Определение характеристик этих клонов обобщено в **таблице 10**, и демонстрируется, что коррекция потенциальных участков неблагоприятных модификаций была успешной. Никакого отрицательного эффекта в отношении связывания клеток не наблюдалось, и все три клон продемонстрировали эффективное уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих BAFF-R (**фиг. 19**). Однако термостабильность молекул составляла  $T_{m1} > 65^{\circ}\text{C}$ , как показано на **фиг. 20**.

**Таблица 10.** Краткое описание характеристик мультиспецифических связывающих белков, экспрессирующих связывающие BAFF-R молекулы с откорректированными потенциальными участками неблагоприятных модификаций в последовательности

Тестируемый образец	SEC, мономер (%)	DSC, T <sub>m1</sub> (°C)	Связывание hBAFF-R <sup>+</sup> клеток, EC <sub>50</sub> (нМ)	Цитолиз клеток ВJAB, опосредованный KHYG-A-CD16aV EC <sub>50</sub> (нМ)
AB0898	86,9	61,23	4,3	0,08
AB0899	96,5	58,79	4,3	0,06
AB0900	90,0	59,41	11,7	0,11

[0255] Как описано выше, замена остатков потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательности на определенные аминокислоты в CDR оказывала минимальный эффект на аффинность связывания; однако данные в отношении связывания с клетками, экспрессирующими BAFF-R, и термостабильности позволяют предположить, что дальнейшее улучшение было желательным. Таким образом, последовательности CDRH1 и CDRH2 (CDRH1: GFTFSSY (SEQ ID NO:1) и CDRH2: WYDGSN (SEQ ID NO:2)) подвергали созреванию аффинности в откорректированных по потенциальным участкам неблагоприятных модификаций в остове CDRH3 и применяли давление на скорость диссоциации для отбора клонов с высокой аффинностью. Вкратце, клоны предварительно инкубировали с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His при концентрации 100 пМ, а затем подвергали испытанию с 1 мкМ небитинилированного hBAFF-R-hFc-His в течение 2 часов. Дрожжи, отображающие scFv антитела к BAFF-R, которые оставались связанными с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His, сортировали, и процесс повторяли три раза для обогащения связывающими молекулами с высокой аффинностью с более медленной скоростью диссоциации. Как показано на **фиг. 21**, клоны оставались связанными с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His даже после испытания с давлением на скорость диссоциации, тогда как сравнительный контрольный scFv на основе ианалумаба потерял связывание с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His в этих условиях, что позволило предположить более медленную скорость диссоциации.

[0256] Анализ отдельных клонов продемонстрировал высокую аффинность в отношении hBAFF-R-hFc-His (**фиг. 22**) и, что важно, клоны оставались связанными с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His. Примечательно, что сравнительный scFv на основе ианалумаба характеризовался потерей связывания с биотинилированным hBAFF-R-hFc-His после испытания (**фиг. 22**). Некоторые клоны исключали из дальнейшего рассмотрения, поскольку они содержали дополнительные нежелательные

аминокислоты или свойства. Последовательности выбранных клонов из вышеуказанных исследований показаны в **таблице 11**.

**Таблица 11.** Последовательности CDR выбранных клонов

Последовательность	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB1080scFv	GFTFSSY (SEQ ID NO:1)	WYDASN (SEQ ID NO:23)	RFTHLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:27)
AB1081scFv	GFAFSSY (SEQ ID NO:28)	WYDESN (SEQ ID NO:29)	RFTNLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:30)
AB1084scFv	GFTFSMY (SEQ ID NO:31)	WYDASN (SEQ ID NO:23)	RFTRLRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:32)
AB1085scFv	GFTFGSY (SEQ ID NO:33)	WY <u>D</u> GSN (SEQ ID NO:2)	RFTHLRGQYIEDYGM <u>D</u> VDV (SEQ ID NO:34)

Потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательности подчеркнуты и выделены жирным шрифтом, а остатки, демонстрирующие разнообразие между клонами, выделены жирным шрифтом.

[0257] Отобранные клоны из описанных выше исследований с испытанием скорости диссоциации получали в виде мультиспецифических связывающих белков, содержащих scFv соответствующих связывающих молекул и двух отличных от связывающих BAFF-R молекул, экспрессировали в клетках Expi293 и определяли их характеристики по связыванию с клетками, экспрессирующими hBAFF-R, и клетками, экспрессирующими BAFF-R яванского макака, способности лизировать раковые клетки, экспрессирующие BAFF-R, в анализе цитотоксичности, опосредованной KHYG-1-CD16aV, способности блокировать взаимодействия BAFF-BAFF-R, термостабильности (дифференциальная сканирующая флуориметрия, DSF) и гидрофобности (НІС) (результаты обобщены в **таблице 12**). Аффинность связывания AB1080, AB1081 и AB1085 с BAFF-R<sup>+</sup> клетками была улучшена по сравнению с исходными клонами (**фиг. 23А-23В** по сравнению с **таблицей 12**). Кроме того, аффинность связывания с супоBAFF-R была аналогичной аффинности связывания с hBAFF-R (**фиг. 23А-23В**). Отсутствие полиспецифичности подтверждали посредством анализа PSR (**фиг. 24А-24В**). AB1084 исключали из дальнейшего исследования вследствие длительного времени удерживания на НІС и являющейся результатом этого

возможности более высокой склонности к агрегации. Улучшенные мультиспецифические связывающие белки продемонстрировали значительно более высокую эффективность, чем мультиспецифический связывающий белок на основе последовательности ианалумаба (фиг. 25А-25В). Кроме того, наблюдали улучшение эффективности в более чем десять раз по сравнению с исходным мультиспецифическим связывающим белком АВ0369. Важно отметить, что способность блокировать связывание BAFF-BAFF-R была значительно улучшена по сравнению с исходным мультиспецифическим связывающим белком АВ0369 (фиг. 26).

**Таблица 12.** Краткое описание характеристик отобранных мультиспецифических связывающих белков

Тестируемый образец	Связывание hBAFF-R <sup>+</sup> клеток, EC <sub>50</sub> (нМ)	Связывание sBAFF-R <sup>+</sup> клеток, EC <sub>50</sub> (нМ)	Цитолиз, EC <sub>50</sub> (нМ)	НІС, время удерживания (мин)	DSF, T <sub>m1</sub> (°C)
AB1080-002	1,97	1,36	0,03	11,40	66,3
AB1081-002	>8	>14	0,05	11,45	65,9
AB1084-001	-	-	0,06	11,79	67,5
AB1085-001	5,78	4,34	0,08	9,55	68,1

**[0258]** Эти мультиспецифические связывающие белки удовлетворяли критериям приемлемой термостабильности по сравнению с контролями в виде адалиумаба (Humira) и пембролизумаба (Keytruda) (фиг. 27). Хроматограммы НІС выявили, что время удерживания АВ1080 и АВ1081 составляло 11,4 и 11,5 мин соответственно. АВ1085 продемонстрировало время удерживания, составляющее 9,5 минуты, что находится на нижней границе для одобренных терапевтических антител и антител на поздней стадии разработки, что позволяет предположить очень благоприятную гидрофобность (фиг. 27).

**[0259]** АВ1080 и АВ1081 продемонстрировали улучшенное связывание с BAFF-R и не содержали каких-либо потенциальных участков неблагоприятных модификаций в последовательностях CDR; однако их гидрофобность была высокой по сравнению с панелью сравнительных терапевтических антител. АВ1085 продемонстрировало требуемую гидрофобность и аффинность, но содержало потенциальные участки неблагоприятных модификаций в последовательностях CDRH2 и CDRH3 (фиг. 28).

Последовательности AB1080, AB1081 и AB1085 сравнивали, а последовательность AB1080 анализировали и дополнительно корректировали с получением мутации W на Q, снижающей гидрофобность (CDRH3: RFTMLRGWYIEDYGMDV (SEQ ID NO:14) на RFTMLRGQYIEDYGMDV (SEQ ID NO:13)). Полученный мультиспецифический связывающий белок AB1424/AB1612 продемонстрировал благоприятную низкую гидрофобность, что попадает в пределы диапазона для хорошо себя зарекомендовавших биологических препаратов (**фиг. 29**) с одновременным сохранением такой же высокой аффинности в отношении BAFF-R (**таблица 13, фиг. 30А-30В**), эффективного блокирования связывания BAFF-R-BAFF (**фиг. 1**) и последовательности, не содержащей потенциальных участков неблагоприятных модификаций, что является характерным для исходного AB1080 (**таблица 14**).

**Таблица 13.** Краткое описание связывания BAFF-R и блокирования BAFF-R-BAFF мультиспецифическими связывающими белками линии AB1424/AB1612

Молекула	Связывание клеток с BAFF-R яванского макака, EC <sub>50</sub> (нМ)	Связывание клеток с BAFF-R человека, EC <sub>50</sub> (нМ)	Блокирующий лиганд, IC <sub>50</sub> (нМ)
AB0369-001	7,11	6,80	>1000
AB1080-003	2,36	2,71	5,72
AB1085-001	3,29	4,48	12,67
AB1612-003	1,85	3,09	6,76
Человеческий IgG1k	N/A	N/A	N/A

**Таблица 14.** Сравнение CDR, связывающих BAFF-R, у AB1424/AB1612 и его предшественников

TriNKET	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB0369	GFTFSSY (SEQ ID NO:1)	WYDGSN (SEQ ID NO:2)	RFT <u>M</u> LRGLIIEDY <u>G</u> M <u>D</u> V (SEQ ID NO:3)
AB1080	GFTFSSY (SEQ ID NO:1)	WYDASN (SEQ ID NO:23)	RFT <u>H</u> LRGWYIEDYGLDV (SEQ ID NO:27)

TriNKET	CDRH1	CDRH2	CDRH3
AB1085	GFTFGSY (SEQ ID NO:33)	WYDGSN (SEQ ID NO:2)	RFTHLRGQYIEDYGM <u>D</u> V (SEQ ID NO:34)
AB1424/AB1612	GFTFSSY (SEQ ID NO:1)	WYDASN (SEQ ID NO:23)	RFTHLRGQYIEDYGLDV (SEQ ID NO:38)

**[0260]** В заключение проводили две кампании по обнаружению антител с использованием иммунизации рекомбинантным белком и ДНК-иммунизации. В ходе первой кампании идентифицировали четыре антитела со средней аффинностью, не блокирующих BAFF-R-BAFF. Одна связывающая молекула, AB0369scFv, которую обнаружили в ходе второй кампании, проявила способность блокировать взаимодействия BAFF-R-BAFF. Интенсивная разработка AB0396scFv с помощью нескольких циклов созревания аффинности, коррекции потенциальных участков неблагоприятных модификаций и рациональной разработки последовательности привела к созданию связывающей молекулы, AB1612/AB1424, которая продемонстрировала требуемые свойства для кандидата на терапевтическое средство.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

**[0261]** Если не указано иное, то полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, упомянутых в данном документе, включено посредством ссылки для всех целей.

#### ЭКВИВАЛЕНТЫ

**[0262]** Настоящее изобретение можно осуществлять в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных характеристик. Следовательно, приведенные выше варианты осуществления следует рассматривать во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие настоящее изобретение, описанное в данном документе. Различные структурные элементы различных вариантов осуществления и различные раскрытые стадии способа могут использоваться в различных комбинациях и перестановках, и все такие варианты следует рассматривать как формы настоящего изобретения. Таким образом, объем настоящего изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в

предшествующем описании, и при этом предполагается, что все изменения, которые соответствуют смыслу и диапазону эквивалентности формулы изобретения, рассматриваются как охваченные ею.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, содержащий:  
вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий последовательность определяющей комплементарность области 1 (CDR1), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:50, последовательность определяющей комплементарность области 2 (CDR2), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:51, и последовательность определяющей комплементарность области 3 (CDR3), содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:52; и  
вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий последовательность CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:4, последовательность CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:5, и последовательность CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:49.
2. Антигенсвязывающий участок, который связывает BAFF-R, где:
  - (a) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:46, 47 и 48 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:4, 5 и 49 соответственно;
  - (b) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:1, 2 и 16 соответственно; и VL содержит последовательности, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:4, 5 и 6 соответственно;
  - (c) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:21, 2 и 22 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:4, 5 и 6 соответственно;
  - (d) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:20, 23 и 26 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно; или

(e) VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:35, 36 и 37 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:4, 5 и 49 соответственно.

3. Антигенсвязывающий участок по п. 1 или п. 2, где VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:46, 47 и 48 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO:4, 5 и 49 соответственно.

4. Антигенсвязывающий участок по п. 1 или п. 2, где VH содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 1, 23 и 38 соответственно; и VL содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, идентичные аминокислотным последовательностям под SEQ ID NO: 4, 5 и 39 соответственно.

5. Антигенсвязывающий участок по п. 4, где VH содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO:40.

6. Антигенсвязывающий участок по п. 5, где VH содержит замену G44C по сравнению с SEQ ID NO:40.

7. Антигенсвязывающий участок по п. 5, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40.

8. Антигенсвязывающий участок по п. 5 или п. 6, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42.

9. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 4-8, где VL содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере

95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO:41.

10. Антигенсвязывающий участок по п. 9, где VL содержит замену G100C по сравнению с SEQ ID NO:41.

11. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 4-9, где VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:41.

12. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 4-10, где VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:43.

13. Антигенсвязывающий участок, содержащий VH, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:40, и VL, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:41, или VH, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:42, и VL, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:43.

14. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-13, где антигенсвязывающий участок представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), Fab-фрагмента или моноклонального антитела.

15. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-14, где антигенсвязывающий участок представлен в виде одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv).

16. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-5 или п. 9, где антигенсвязывающий участок представлен в виде scFv, содержащего аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности под SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45.

17. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 14-16, где scFv содержит аминокислотную последовательность, идентичную последовательности под SEQ ID NO:44 или SEQ ID NO:45.

18. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 14-17, где scFv содержит аминокислотную последовательность, идентичную последовательности под SEQ ID NO:44.

19. Антигенсвязывающий участок, который конкурирует с антигенсвязывающим участком по любому из пп. 1-18 за связывание с BAFF-R.
20. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-19, где антигенсвязывающий участок связывает BAFF-R человека с константой диссоциации ( $K_D$ ), равной 5 нМ или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR).
21. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-20, где антигенсвязывающий участок ингибирует связывание BAFF-R с BAFF.
22. Белок, содержащий антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-21.
23. Белок по п. 22, дополнительно содержащий константную область тяжелой цепи антитела.
24. Белок по п. 23, где константная область тяжелой цепи антитела представляет собой константную область тяжелой цепи человеческого IgG.
25. Белок по п. 24, где константная область тяжелой цепи антитела представляет собой константную область тяжелой цепи человеческого IgG1.
26. Белок по п. 24 или п. 25, где каждая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную аминокислотной последовательности Fc-области человеческого IgG1 дикого типа.
27. Белок по любому из пп. 24-26, где по меньшей мере одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа в одном или нескольких положениях, выбранных 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, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.
28. Белок по любому из пп. 24-27, где по меньшей мере одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1

дикого типа, выбранных 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, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

29. Белок по любому из пп. 24-28, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 и K439; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит одну или несколько мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа в одном или нескольких положениях, выбранных из Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, D401, F405, Y407, K409, T411, и K439, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

30. Белок по п. 29, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены K360E и K409W по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замены Q347R, D399V и F405T по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

31. Белок по п. 29 или п. 30, где одна полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену Y349C по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа; и другая полипептидная цепь константной области тяжелой цепи антитела содержит замену S354C по сравнению с аминокислотной последовательностью Fc-области человеческого IgG1 дикого типа, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

32. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий белок по любому из пп. 22-31 и компонент, представляющий собой лекарственное средство.
33. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 32, где компонент, представляющий собой лекарственное средство, выбран из группы, состоящей из ауристатины, N-ацетил-γ-калихеамицина, майтанзиноида, пирролобензодиазепина и SN-38.
34. Иммуноцитокин, содержащий антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-21 и цитокин.
35. Иммуноцитокин по п. 34, где цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, TNF и IFNα.
36. Биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, содержащий антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-21 и антигенсвязывающий участок, который связывает CD3.
37. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:  
(а) антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-21;  
(b) трансмембранный домен и  
(с) внутриклеточный сигнальный домен.
38. CAR по п. 37, где трансмембранный домен выбран из трансмембранных областей альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, BAFF-R, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, и CD154.
39. CAR по п. 37 или п. 38, где внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен, предусматривающий функциональный сигнальный домен CD3-дзета, общую гамма-цепь FcR (FCER1G), Fc-гамма RIIa, FcR-бета (Fc-эпсилон R1b), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD79a, CD79b, DAP10 и DAP12.
40. CAR по любому из пп. 37-39, где внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен, предусматривающий функциональный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

41. CAR по п. 40, где костимулирующий рецептор выбран из группы, состоящей из OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, NKG2C, B7-H3, лиганда, который связывается с CD83, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS и 4-1BB (CD137) или любой их комбинации.
42. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая CAR по любому из пп. 37-41.
43. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 42.
44. Иммунная эффекторная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 42 или вектор экспрессии по п. 43.
45. Иммунная эффекторная клетка, экспрессирующая CAR по любому из пп. 37-41.
46. Иммунная эффекторная клетка по п. 44 или п. 45, где иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.
47. Иммунная эффекторная клетка по п. 46, где Т-клетка представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup> Т-клетку,  $\gamma\delta$ -Т-клетку или НКТ-клетку.
48. Иммунная эффекторная клетка по п. 44 или п. 45, где иммунная эффекторная клетка представляет собой НК-клетку.
49. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп. 22-31, конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 32 или п. 33, иммуноцитокин по п. 34 или п. 35, биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, по п. 36 или иммунную эффекторную клетку по любому из пп. 44-48 и фармацевтически приемлемый носитель.
50. Способ лечения рака, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества белка по любому из пп. 22-31, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 32 или п. 33, иммуноцитокина по п. 34 или п. 35, биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки, по п. 36, иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 44-48 или фармацевтической композиции по п. 49.
51. Способ по п. 50, где рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому (В-NHL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому из клеток

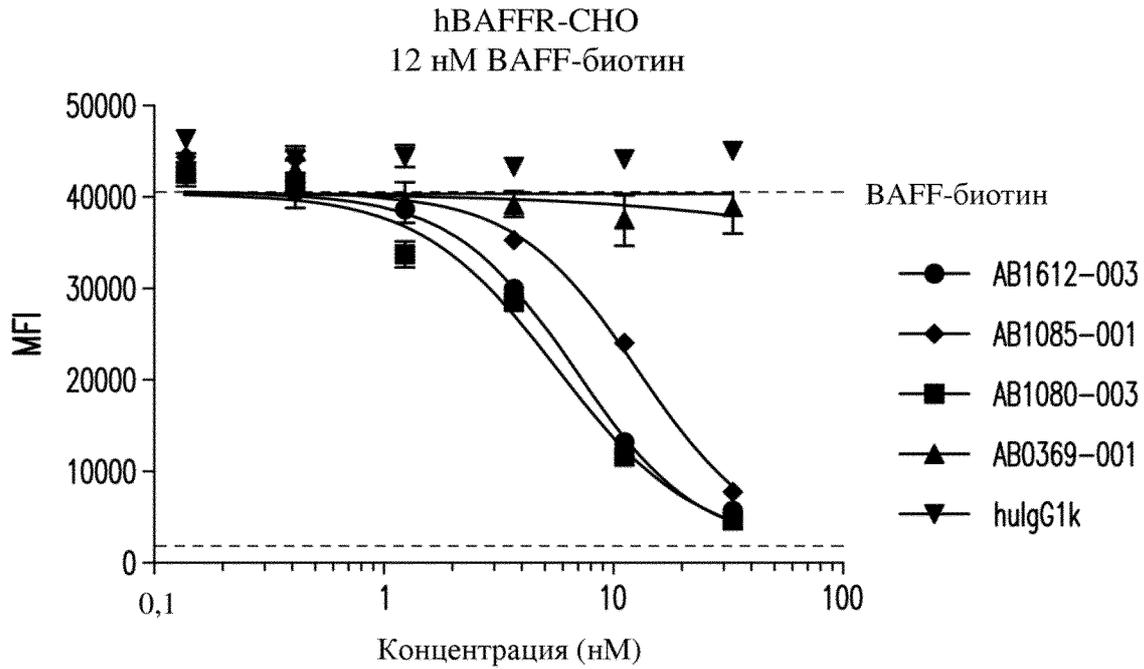
мантийной зоны (MCL), фолликулярную лимфому (FL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), первичную медиастинальную В-клеточную лимфому и острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

52. Способ по п. 50 или п. 51, где рак характеризуется экспрессией BAFF-R.

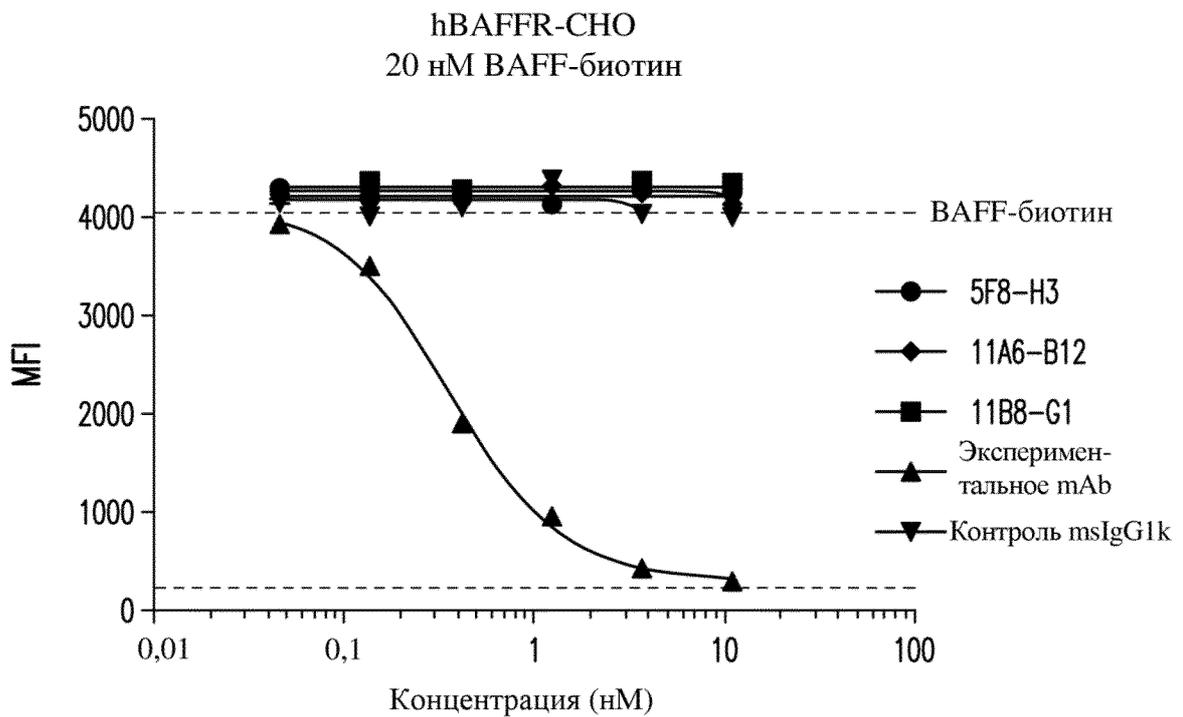
53. Способ лечения аутоиммунного воспалительного заболевания, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества белка по любому из пп. 22-31, конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 32 или п. 33, иммуноцитокина по п. 34 или п. 35, биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки, по п. 36, иммунной эффекторной клетки по любому из пп. 44-48 или фармацевтической композиции по п. 49.

54. Антигенсвязывающий участок по любому из пп. 1-21, белок по любому из пп. 22-31, конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 32 или п. 33, иммуноцитокин по п. 34 или п. 35 или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, по п. 36, где антигенсвязывающий участок, белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, представляют собой очищенные антигенсвязывающий участок, белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки.

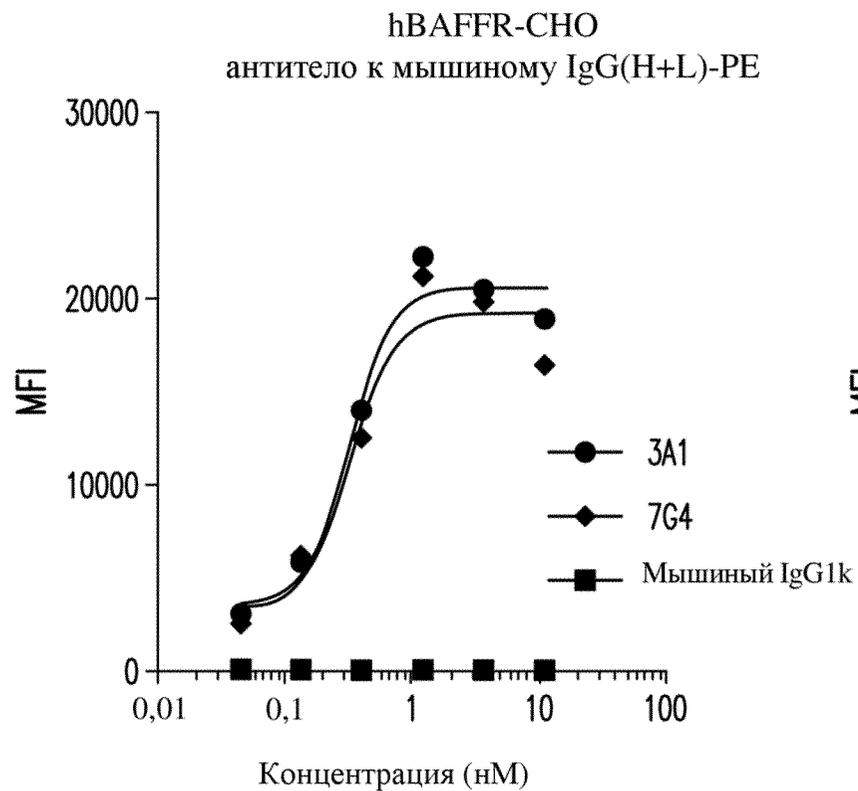
55. Антигенсвязывающий участок, белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, по п. 54, где антигенсвязывающий участок, белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, иммуноцитокин или биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, очищены с помощью способа, выбранного из группы, состоящей из центрифугирования, глубинной фильтрации, лизиса клеток, гомогенизации, замораживания-оттаивания, аффинной очистки, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, ионообменной хроматографии с гидрофобным взаимодействием и хроматографии со смешанным режимом.



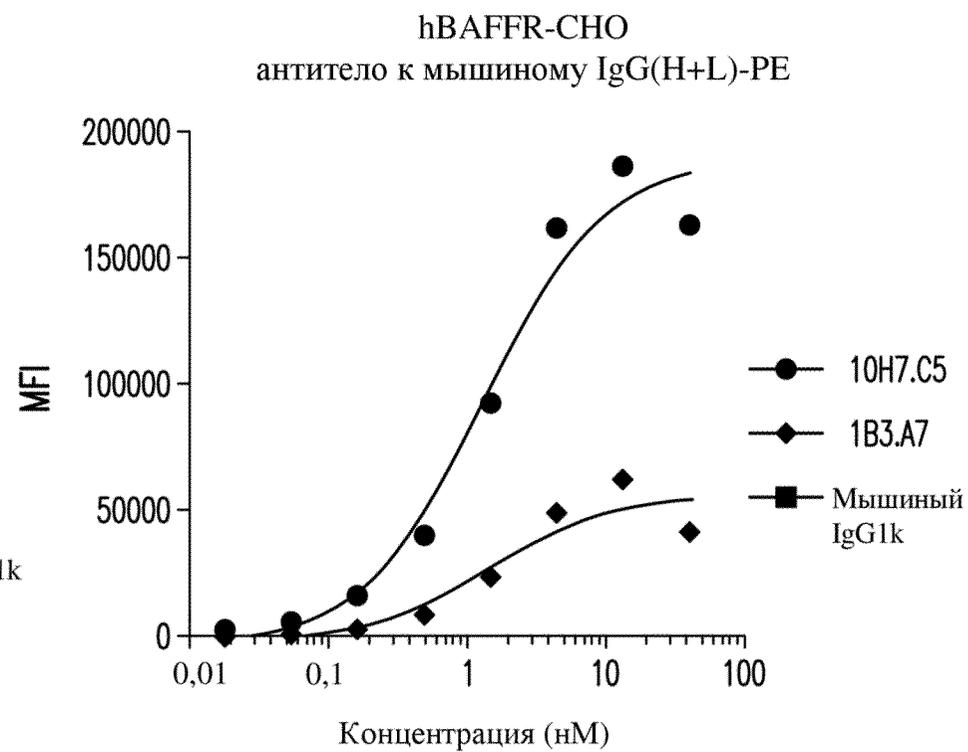
Фиг. 1



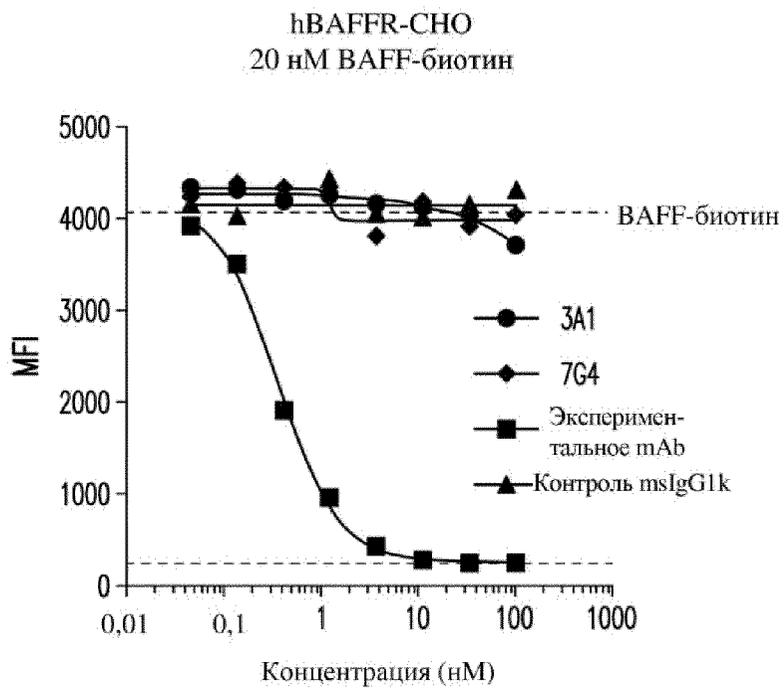
Фиг. 2



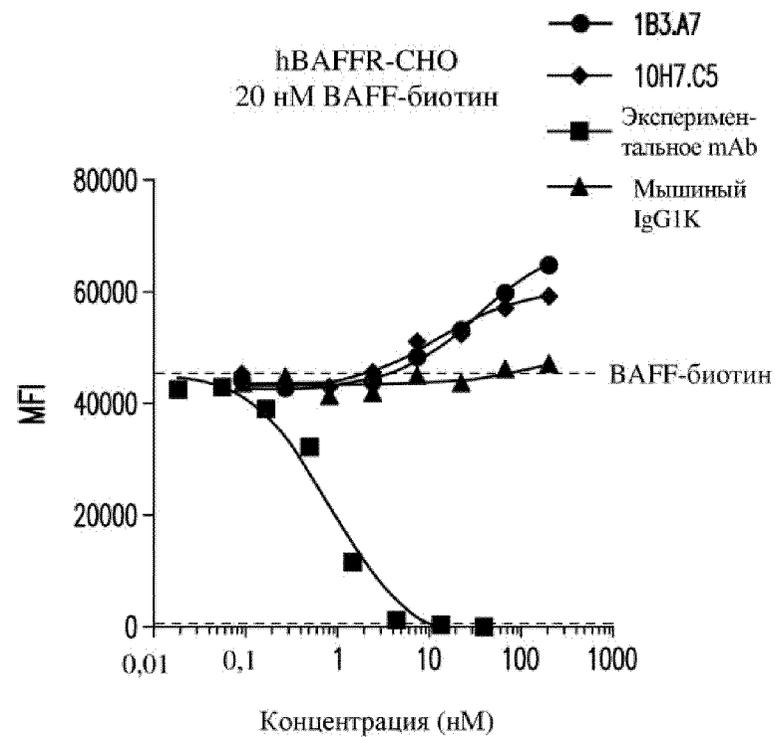
Фиг. 3А



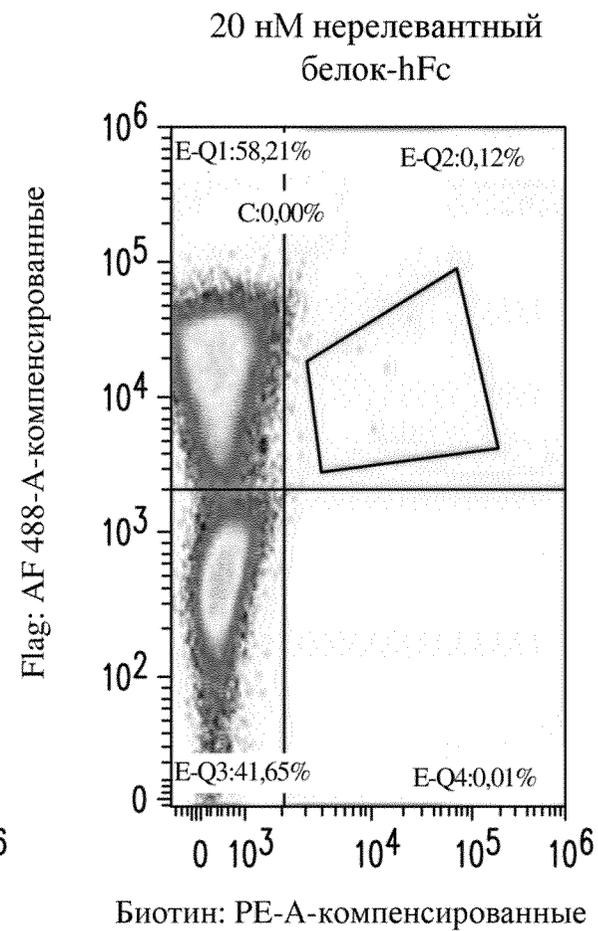
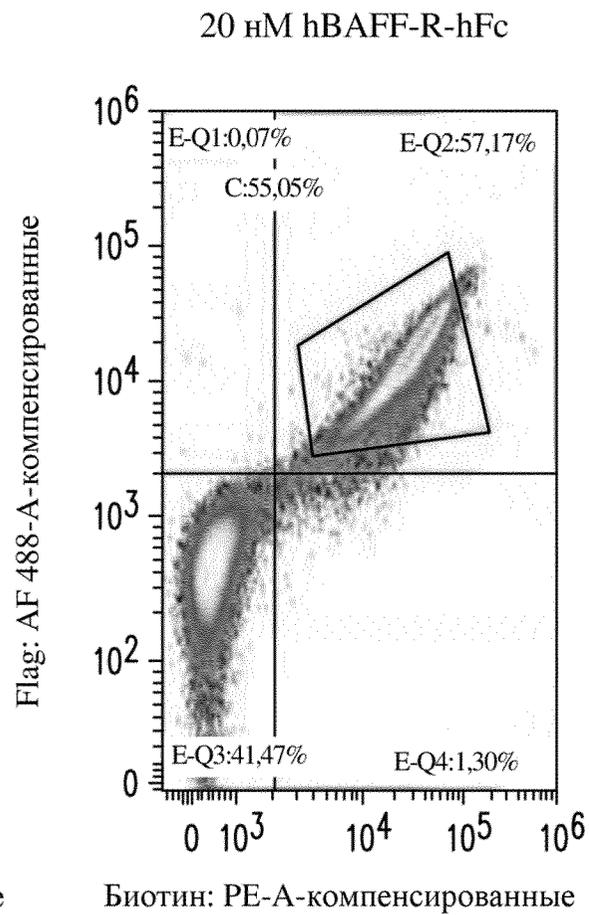
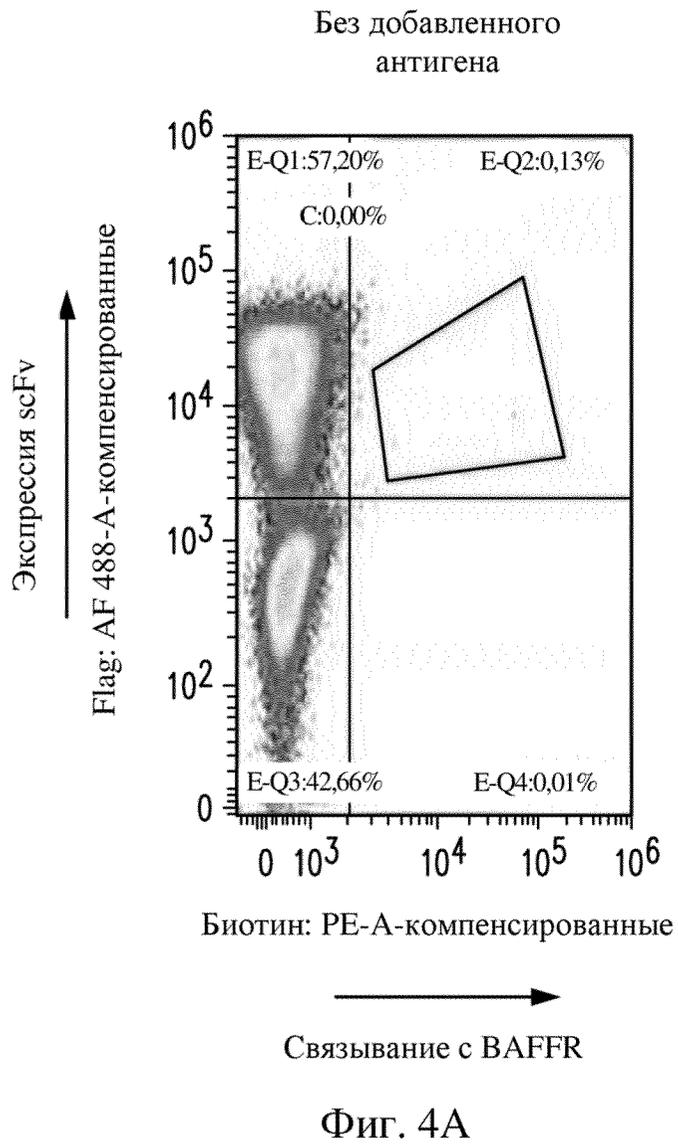
Фиг. 3В

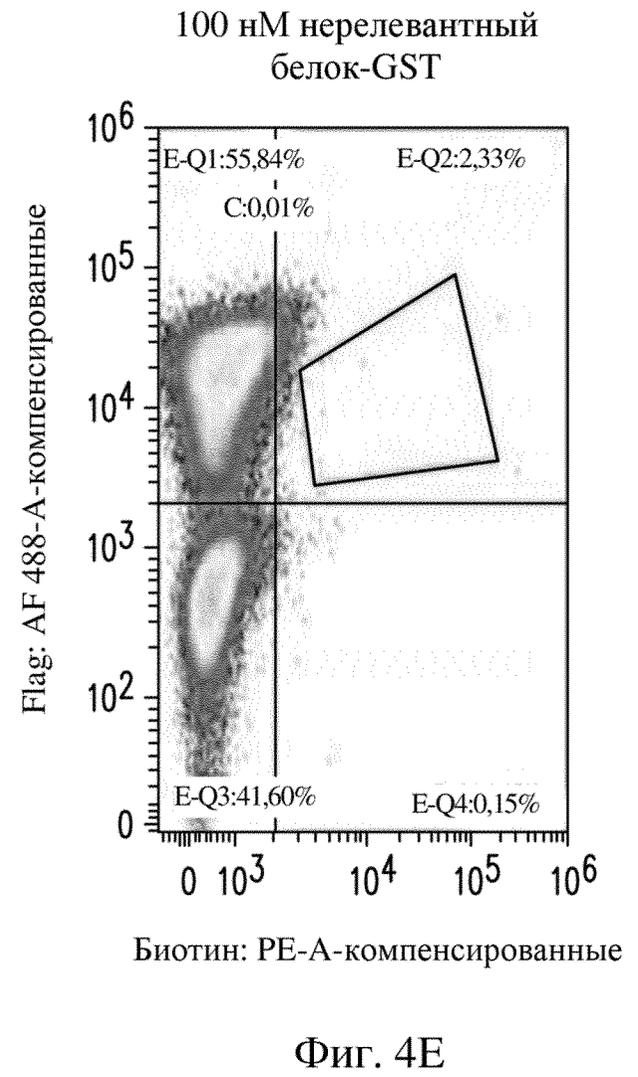
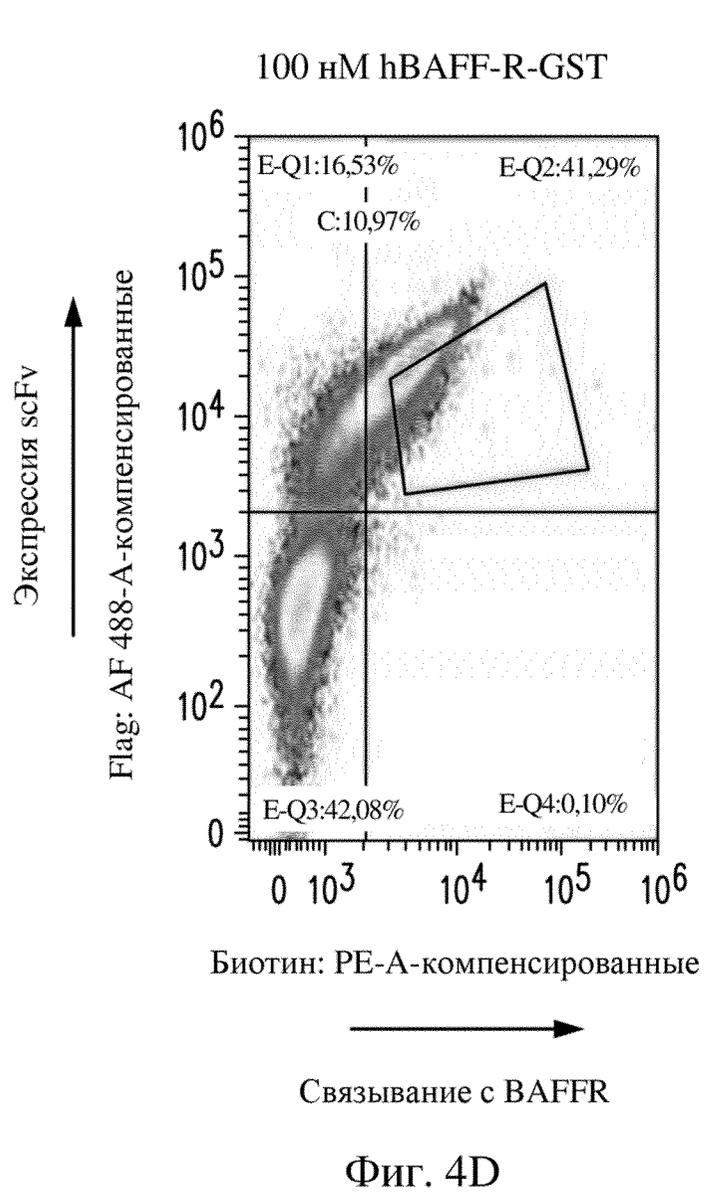


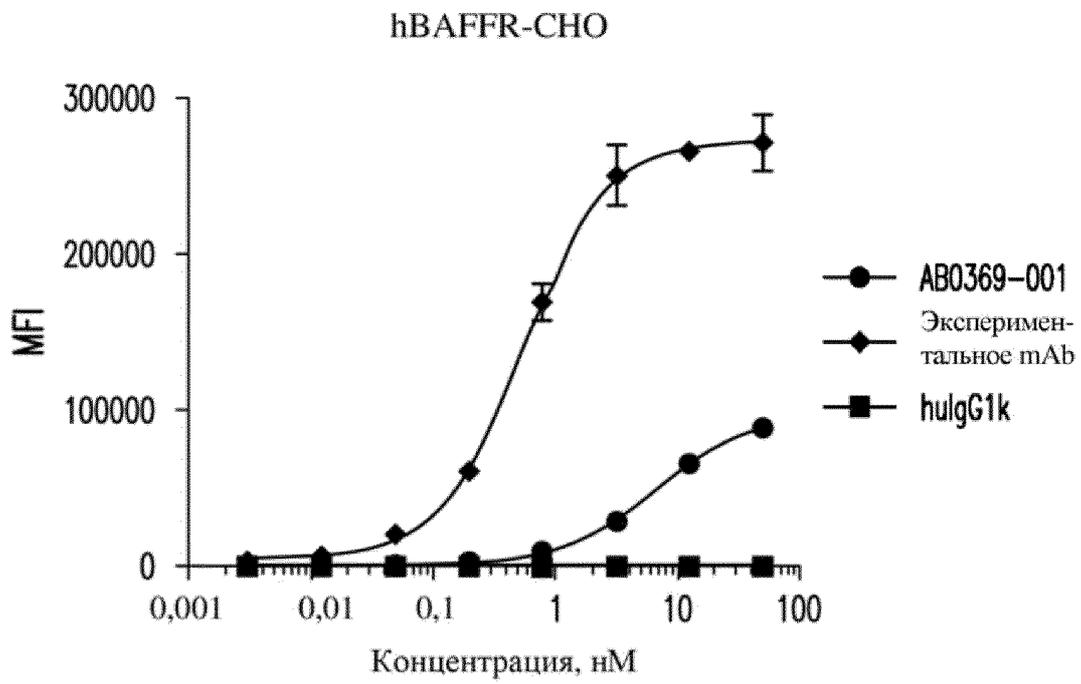
Фиг. 3С



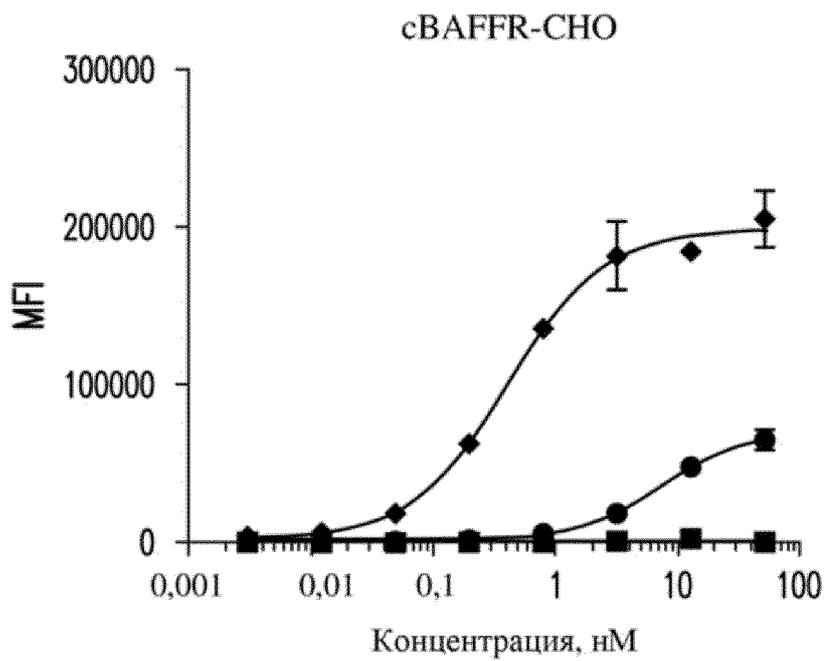
Фиг. 3D



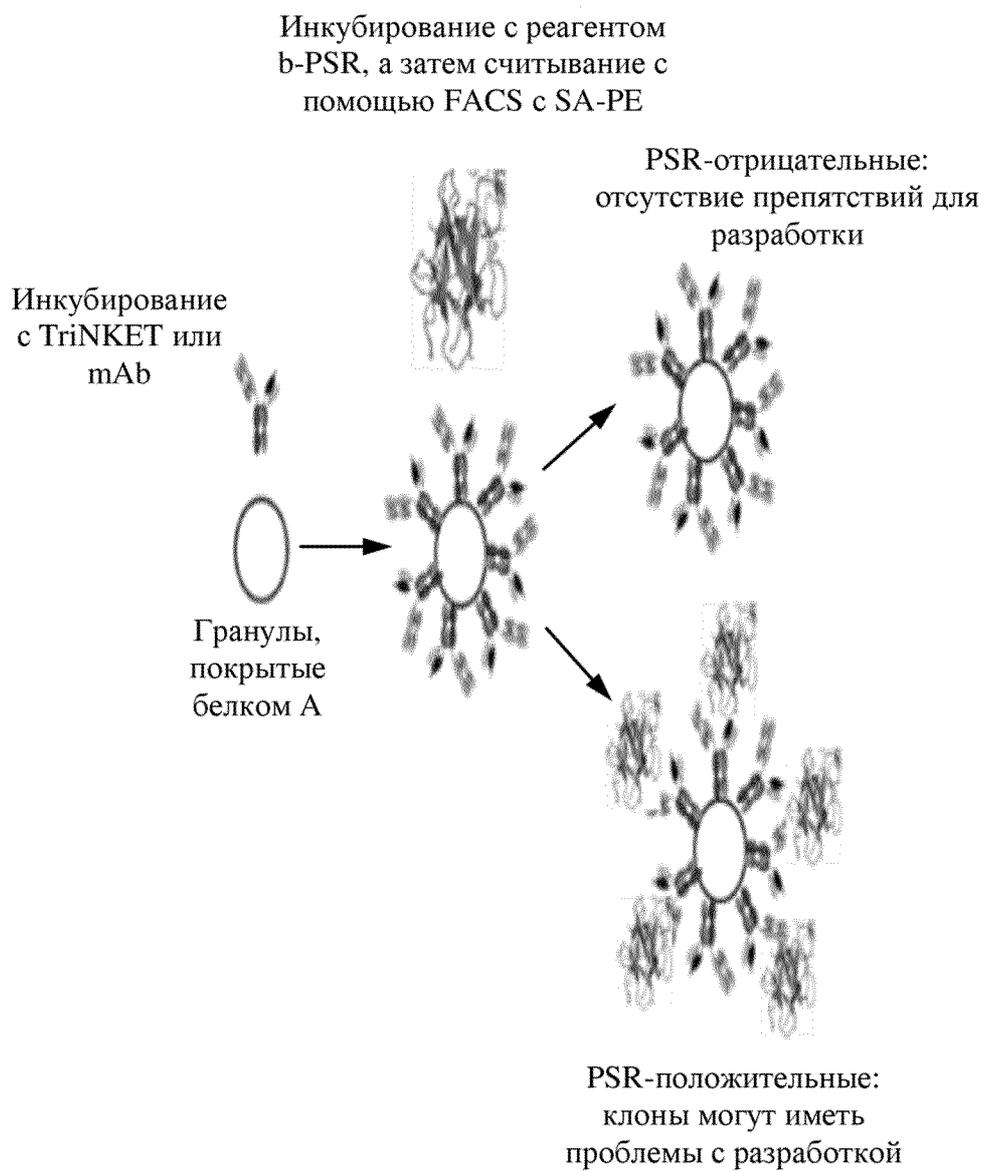




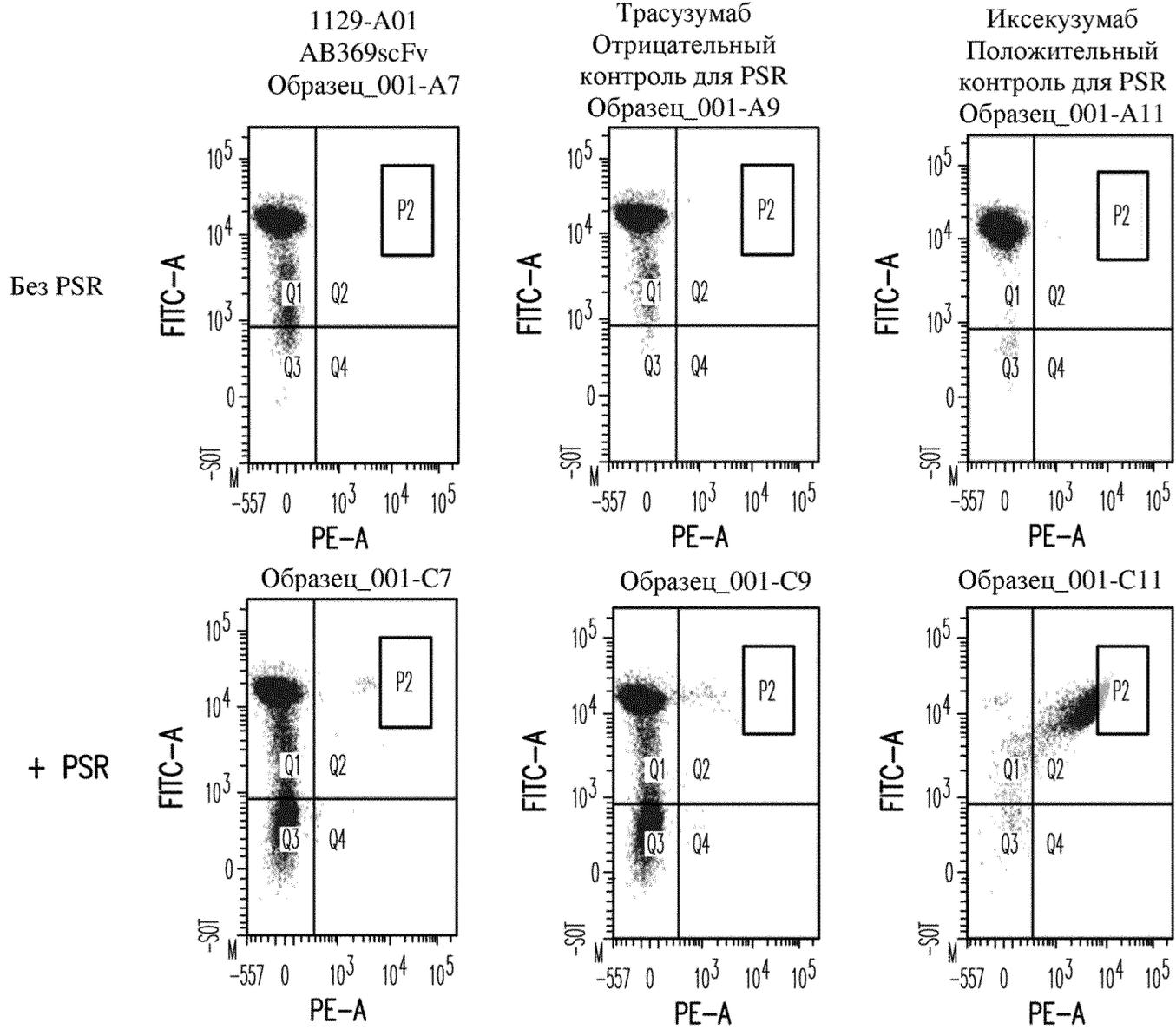
Фиг. 5А

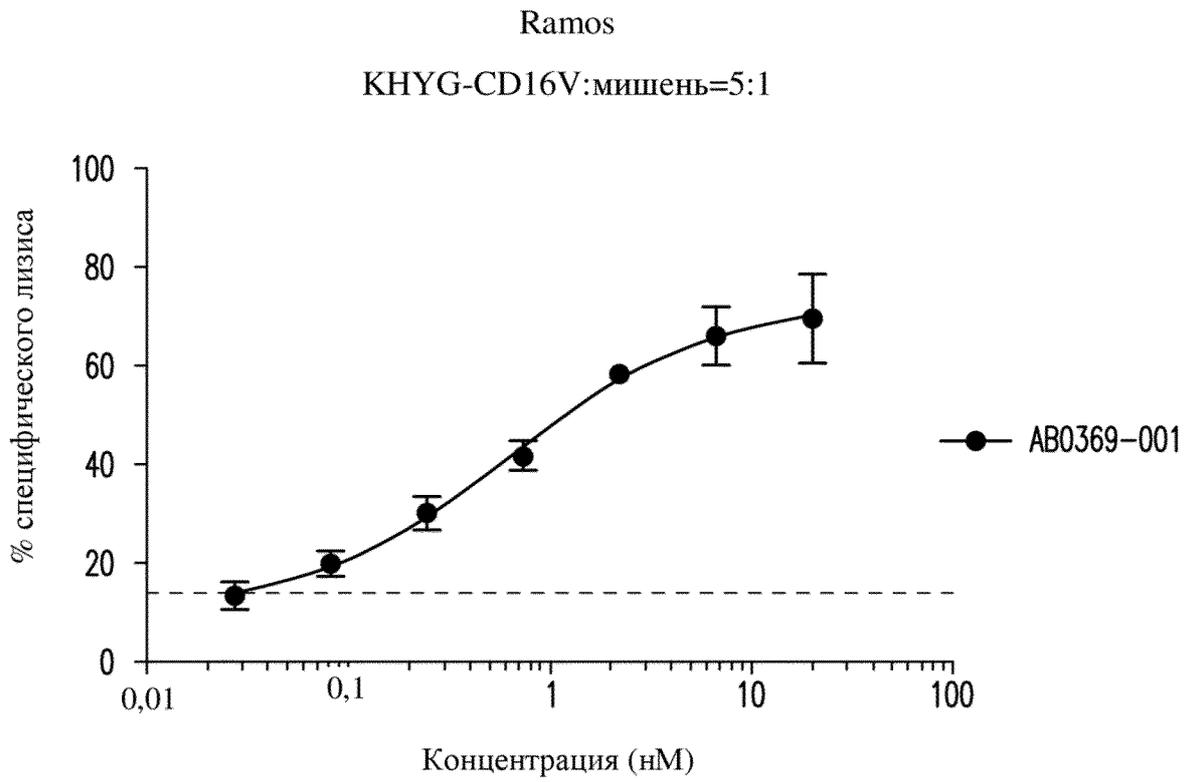


Фиг. 5В

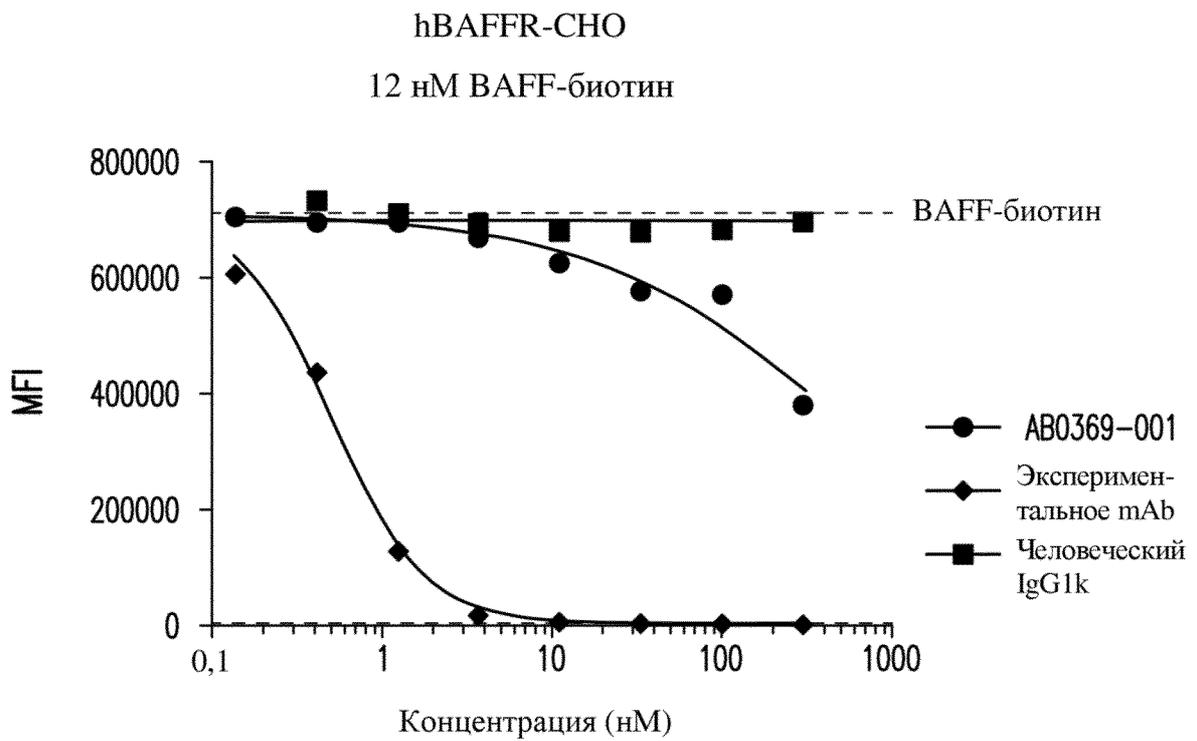


Фиг. 6А



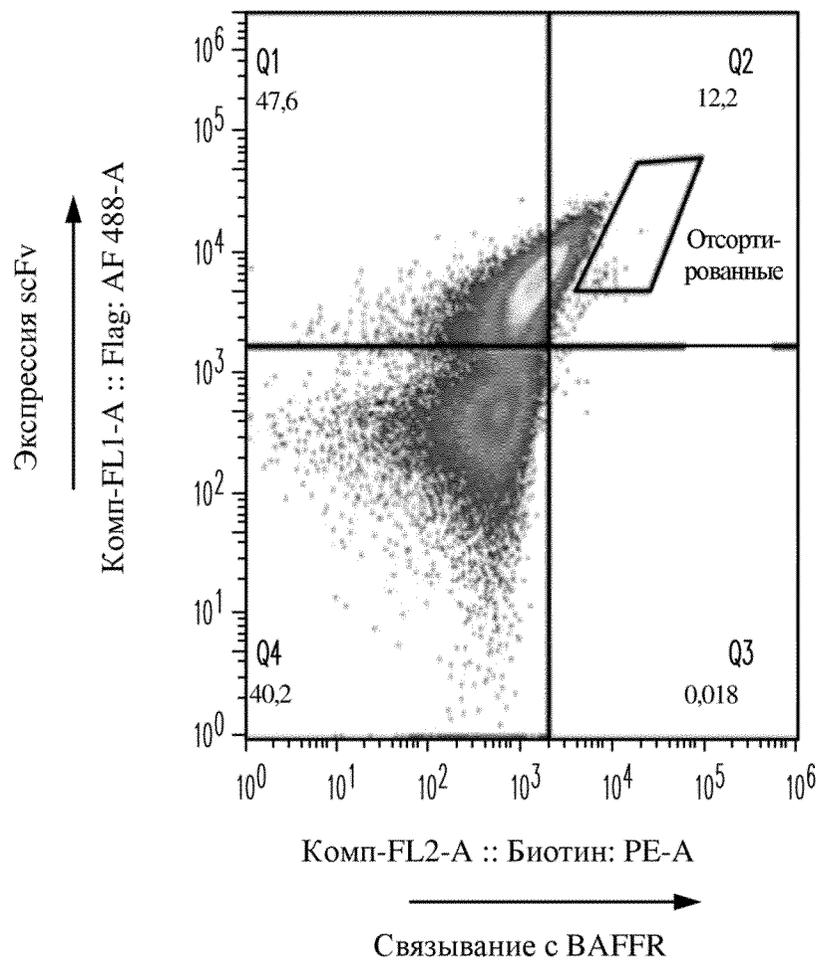


Фиг. 7



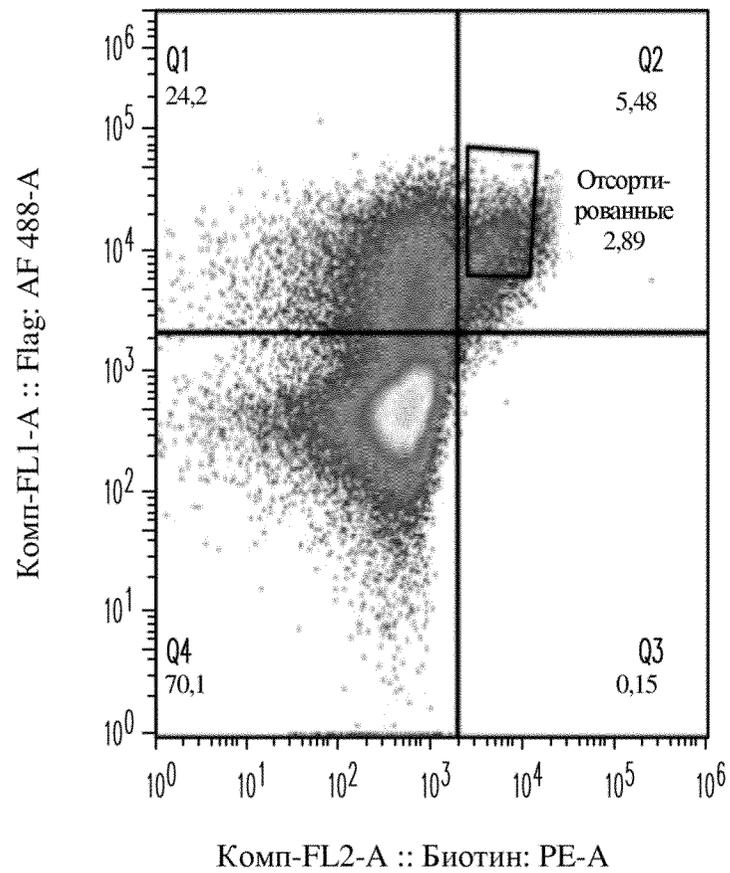
Фиг. 8

Исходный  
AB039scFv (1129\_A01)



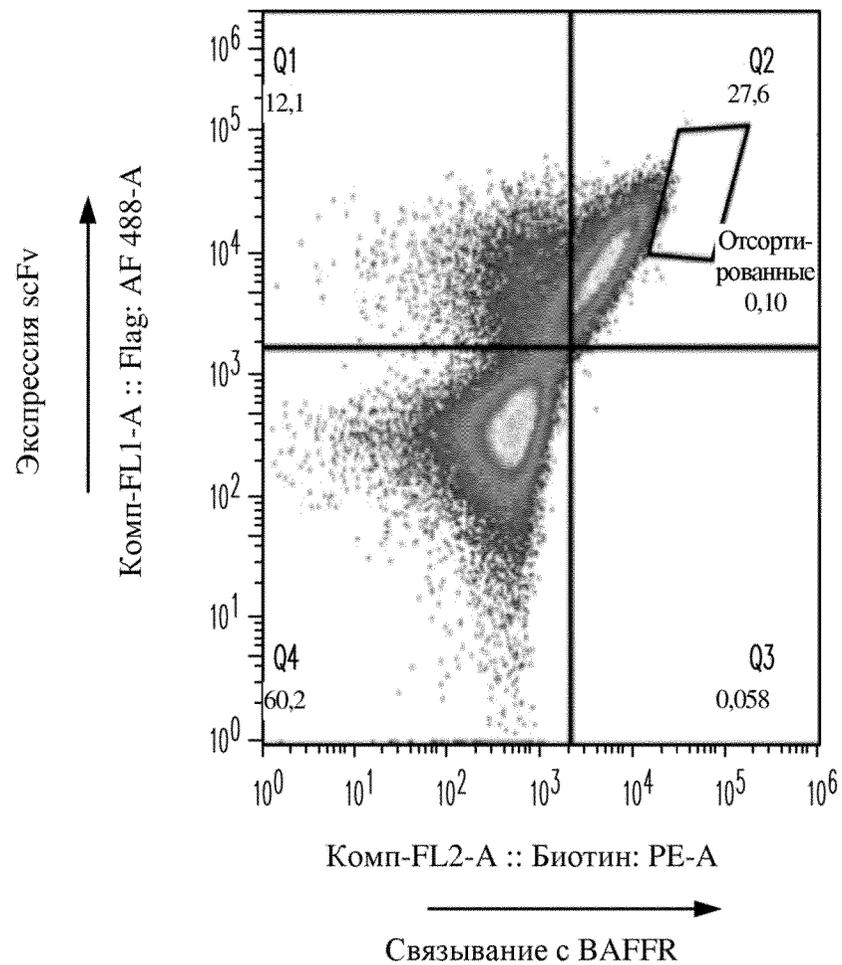
Фиг. 9А

Библиотека 67  
Цикл 1



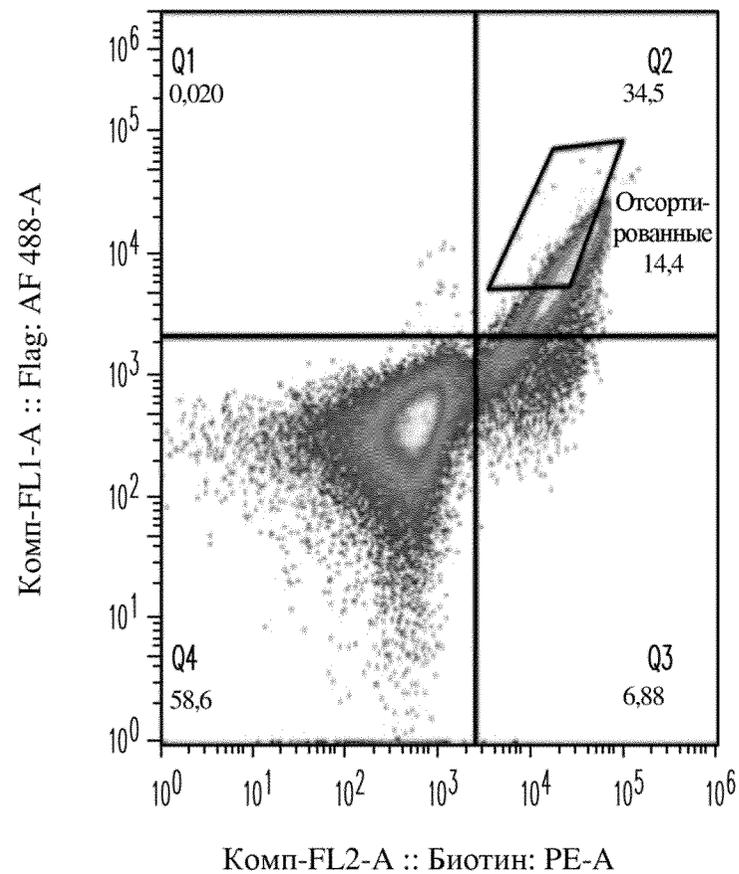
Фиг. 9В

Библиотека 67  
Цикл 2

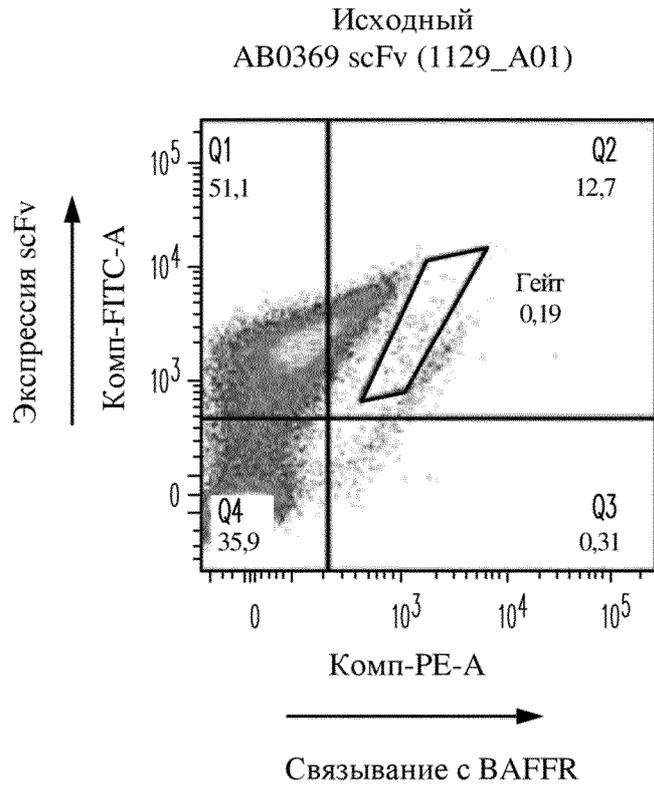


Фиг. 9C

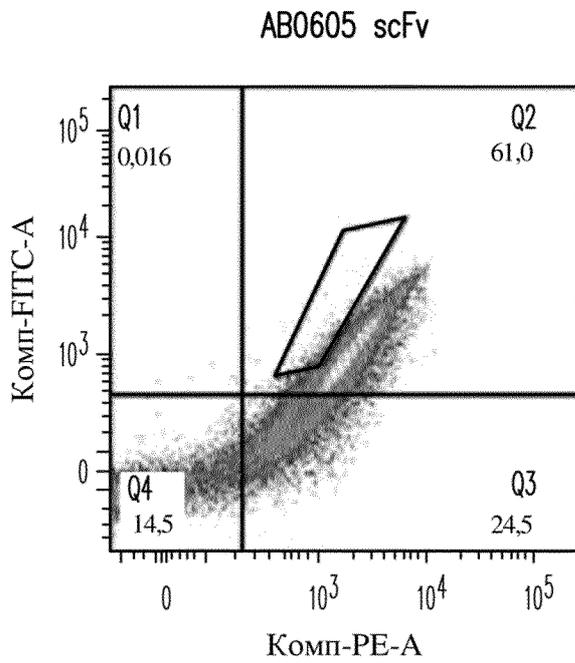
Библиотека 67  
Результат цикла 2



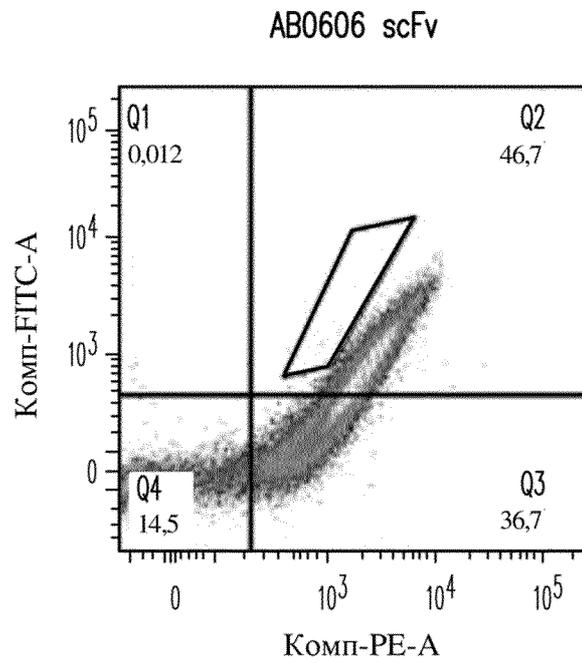
Фиг. 9D



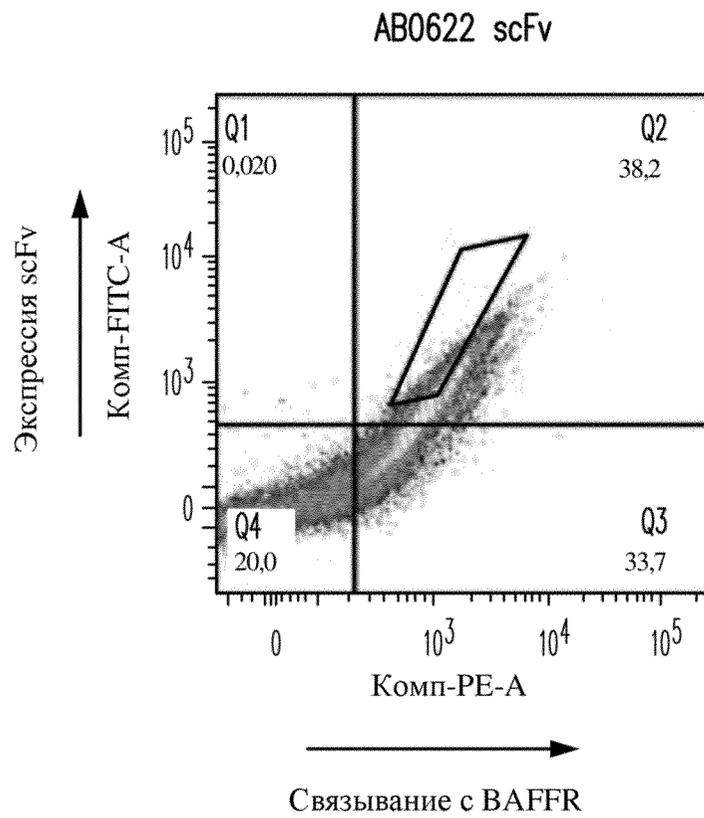
Фиг. 10А



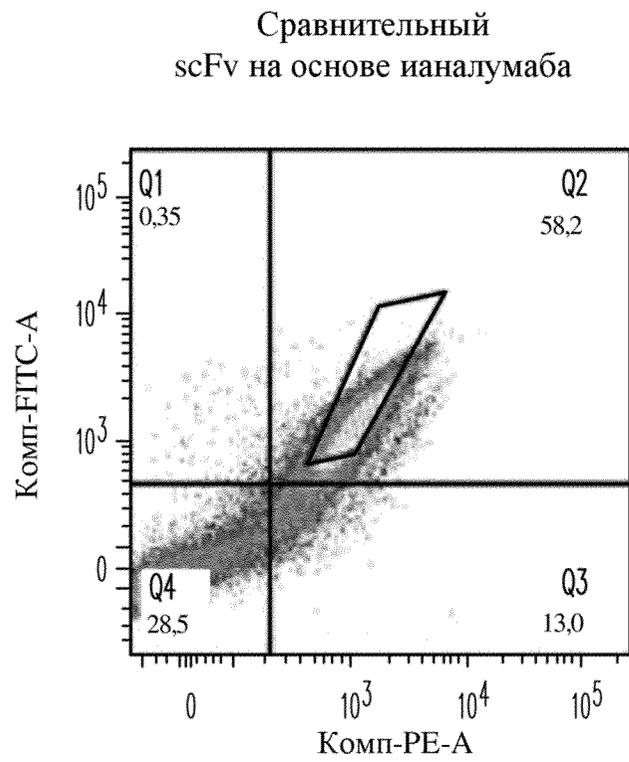
Фиг. 10В



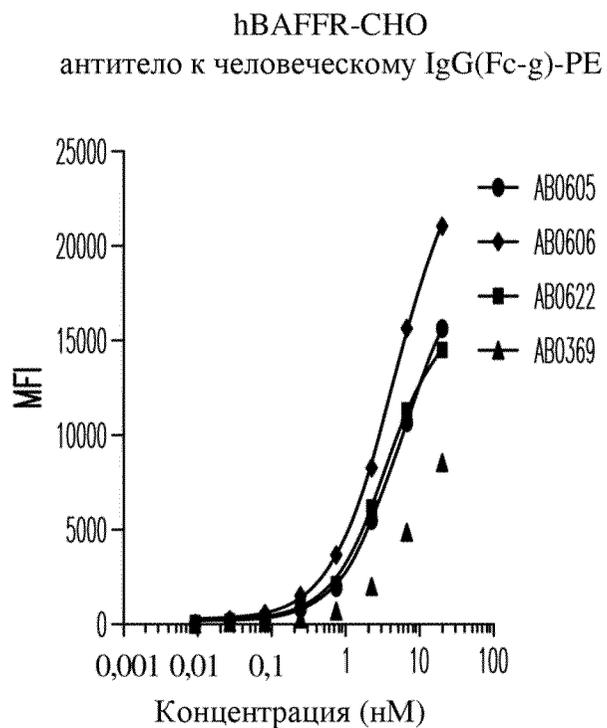
Фиг. 10С



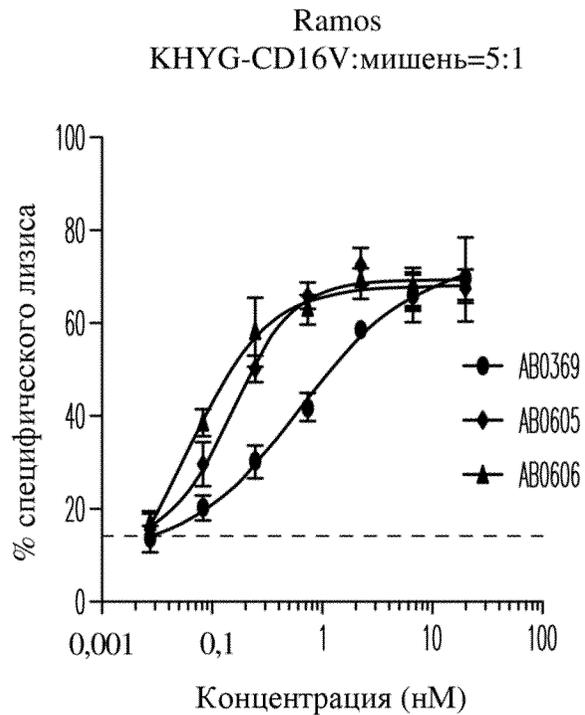
Фиг. 10D



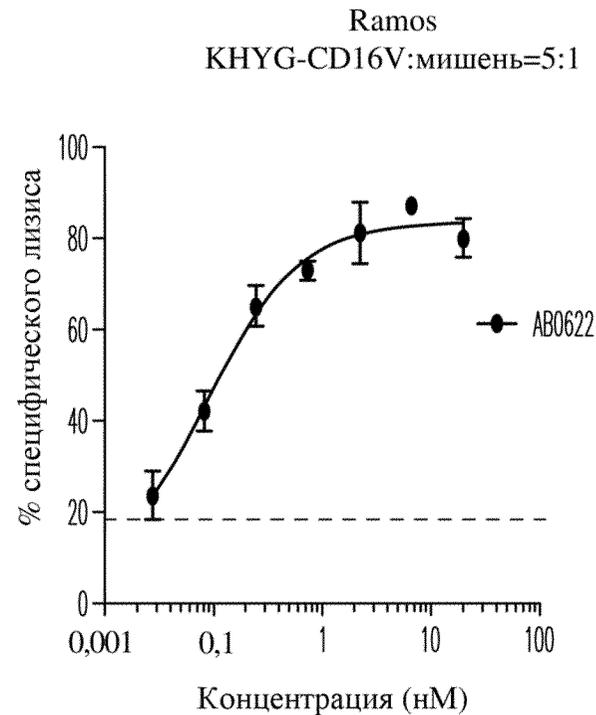
Фиг. 10E



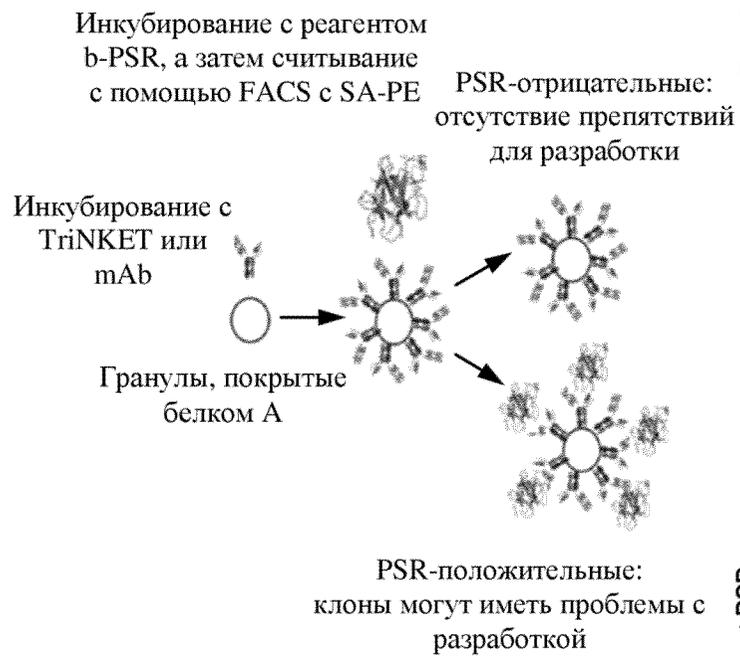
Фиг. 11А



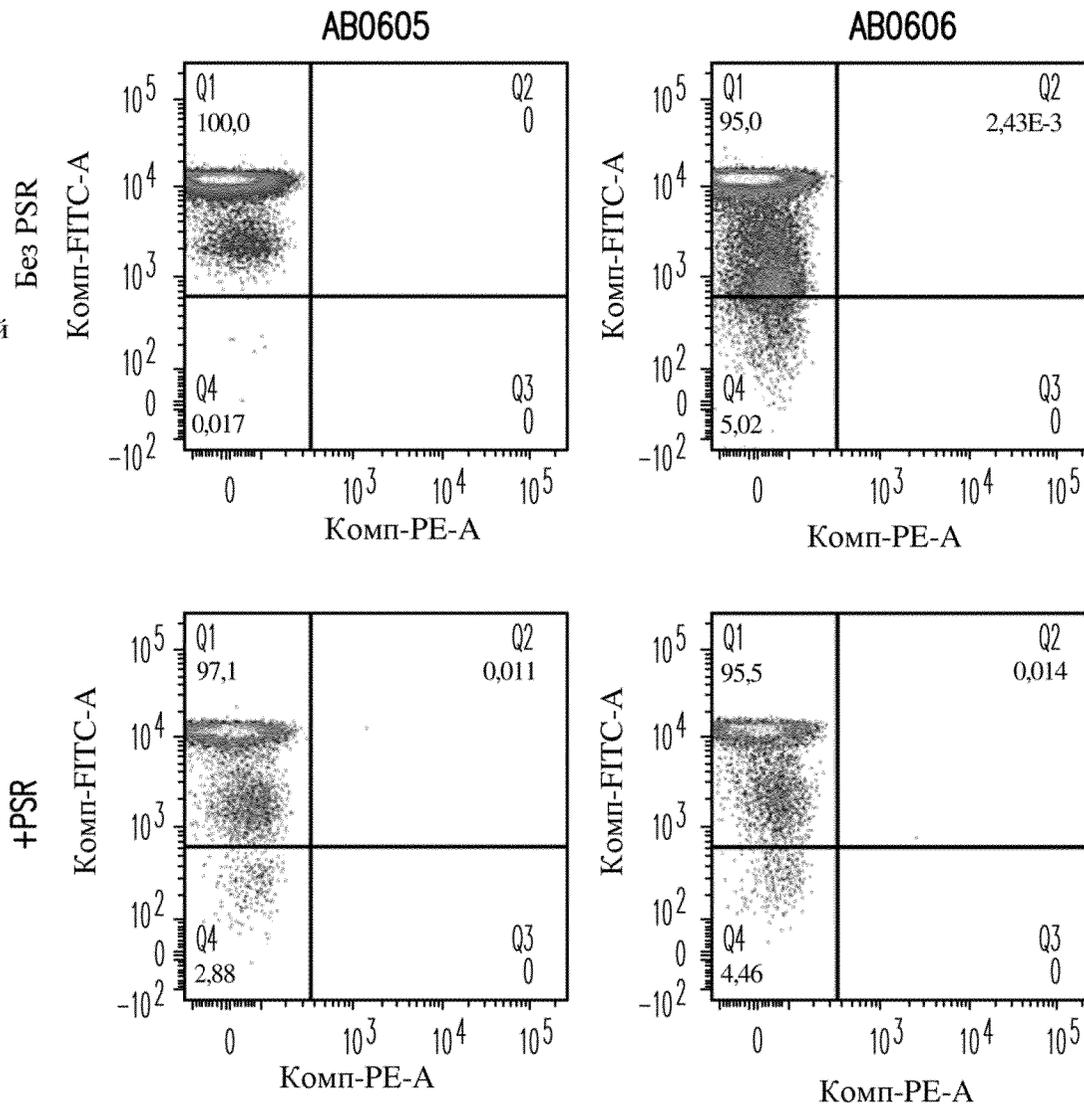
Фиг. 11В



Фиг. 11С

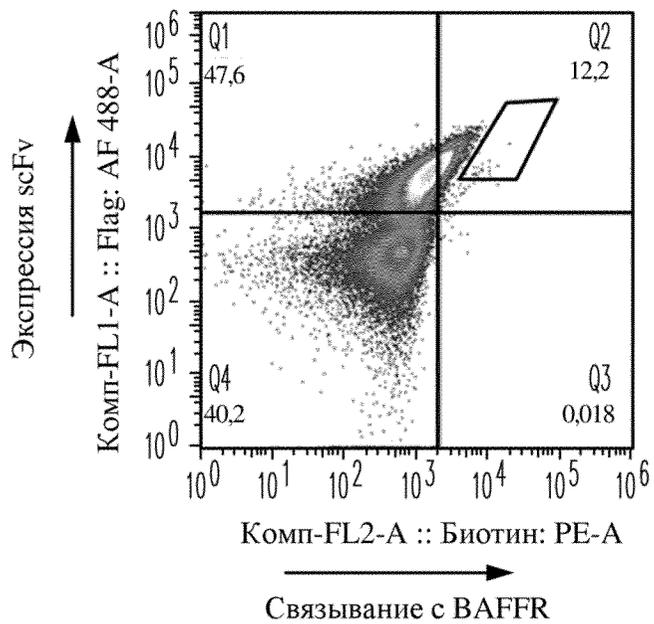


Фиг. 12А



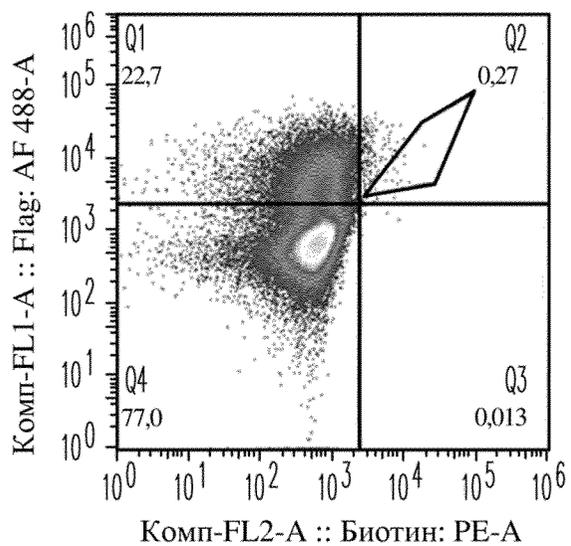
Фиг. 12В

Исходный  
AB0369scFv (1129\_A01)



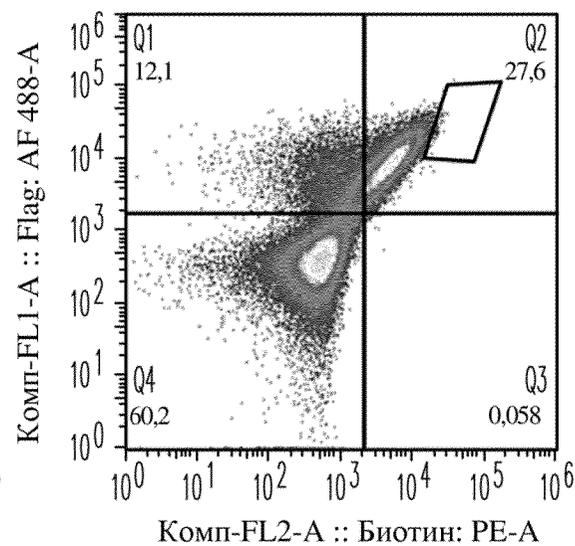
Фиг. 13А

Библиотека 70  
Цикл 1

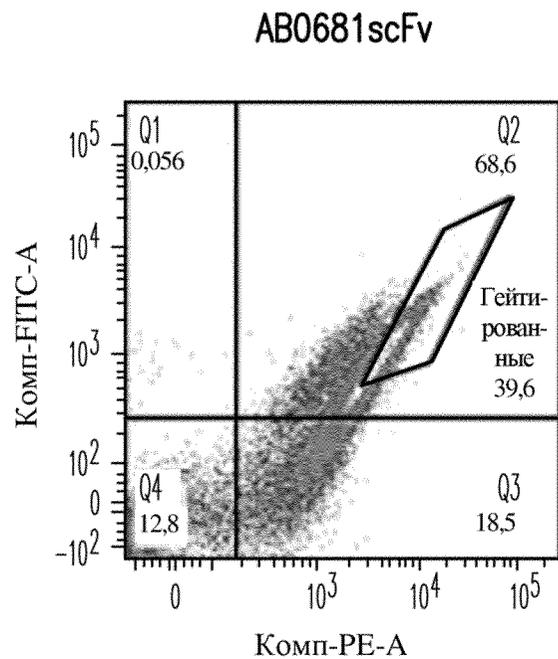
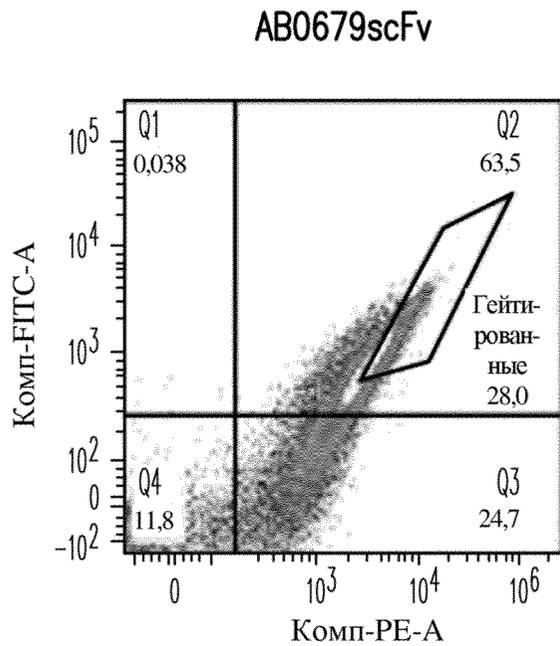
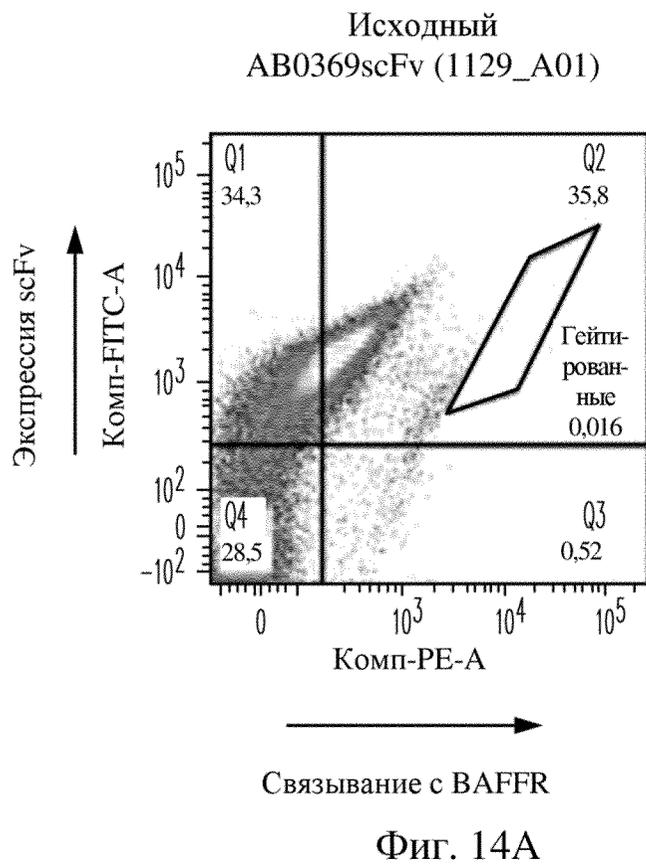


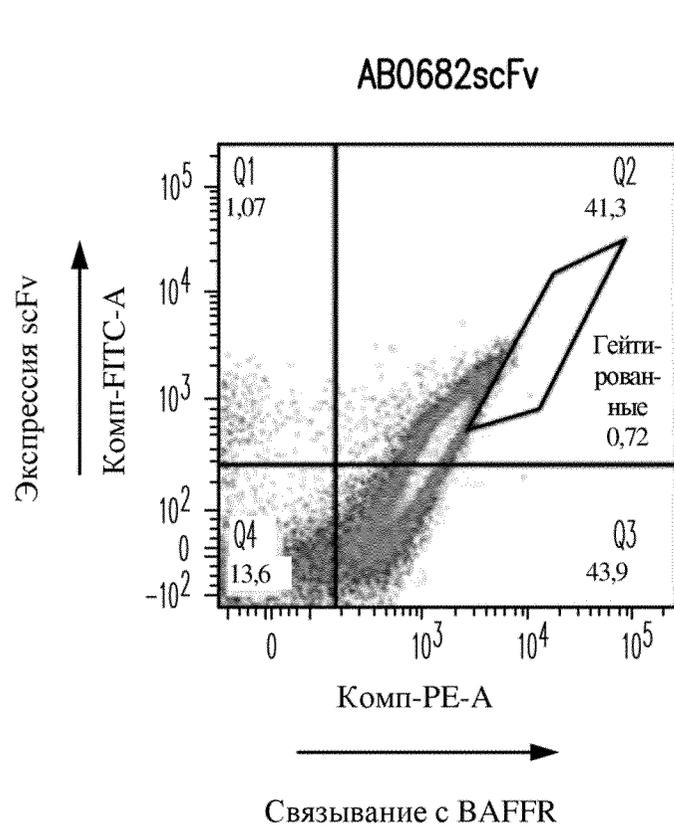
Фиг. 13В

Библиотека 70  
Цикл 2

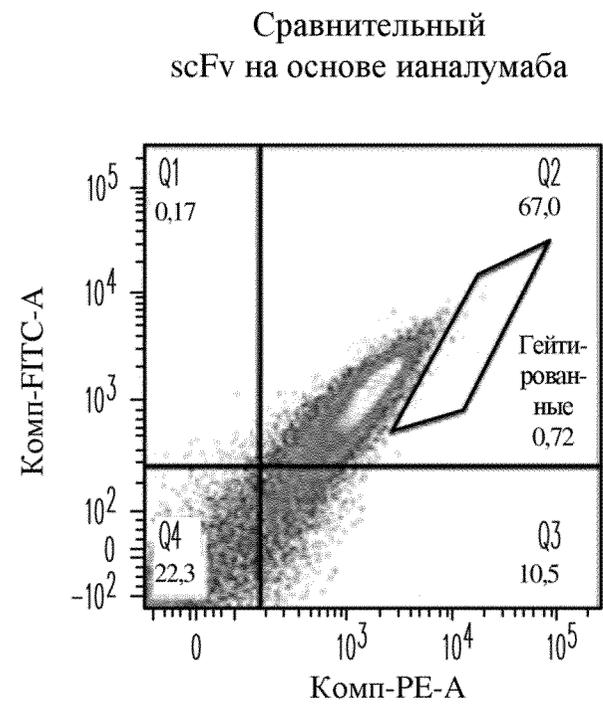


Фиг. 13С

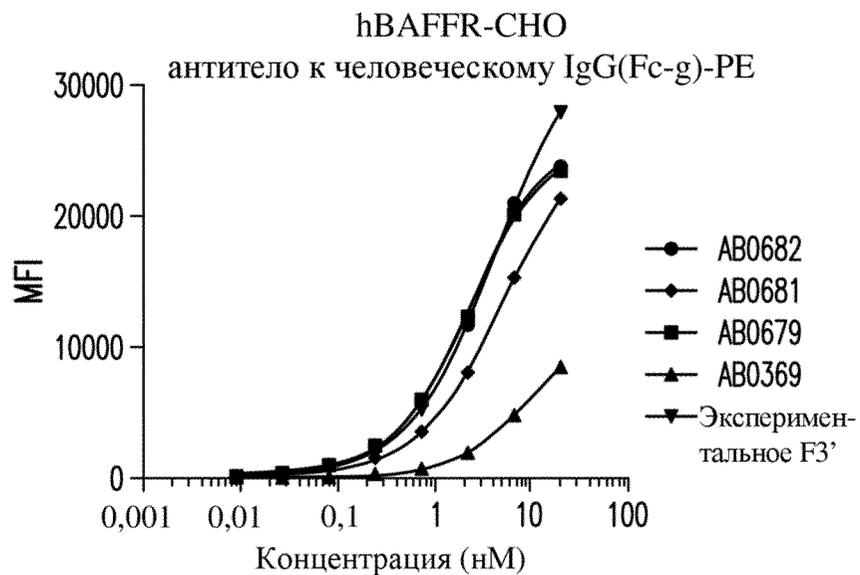




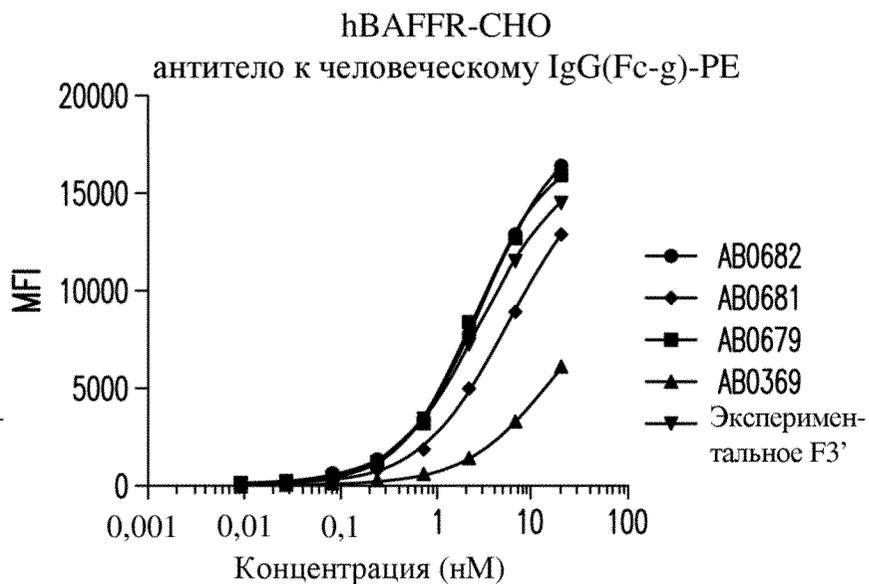
Фиг. 14D



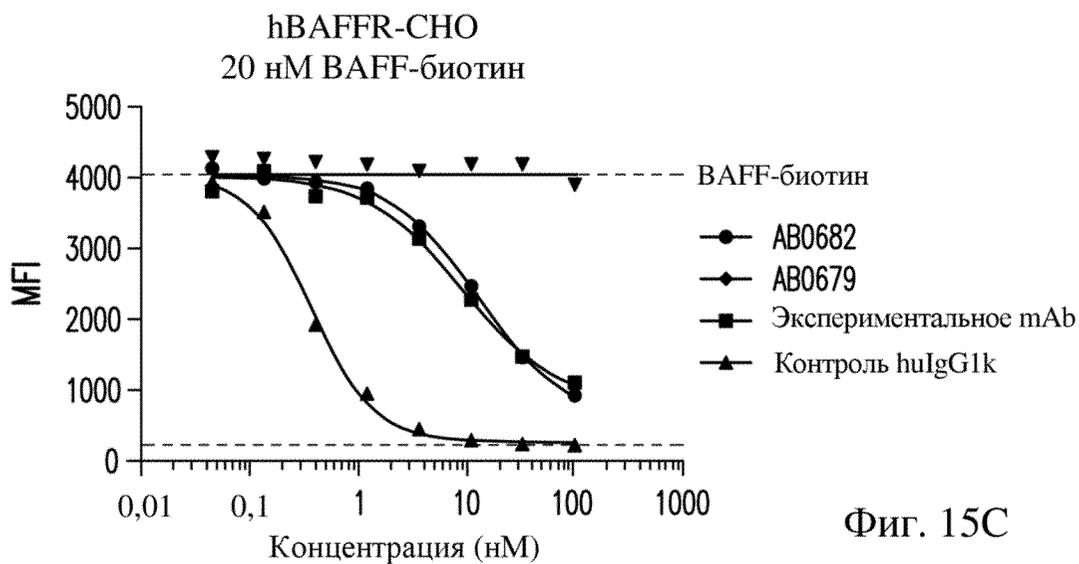
Фиг. 14E



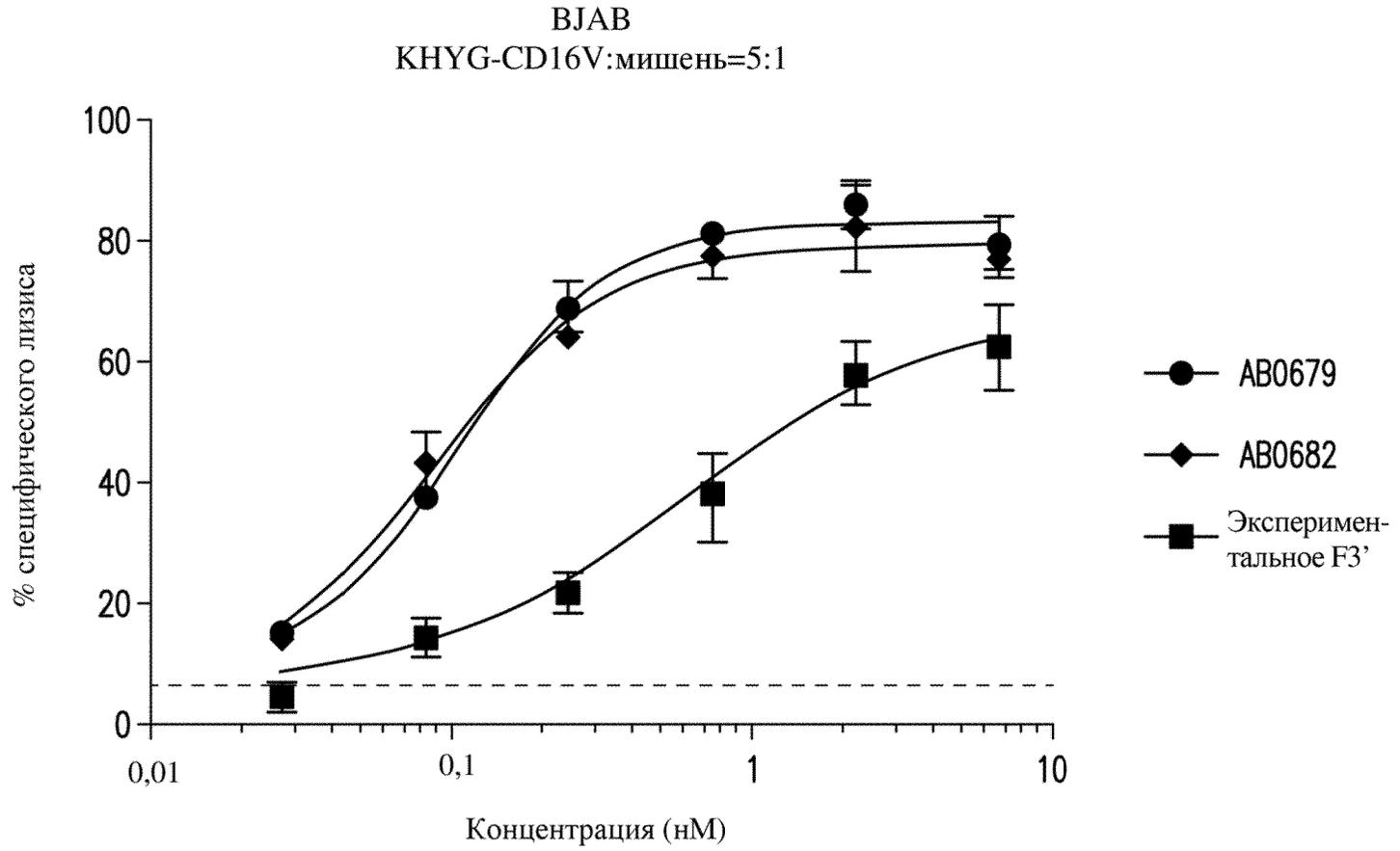
Фиг. 15А



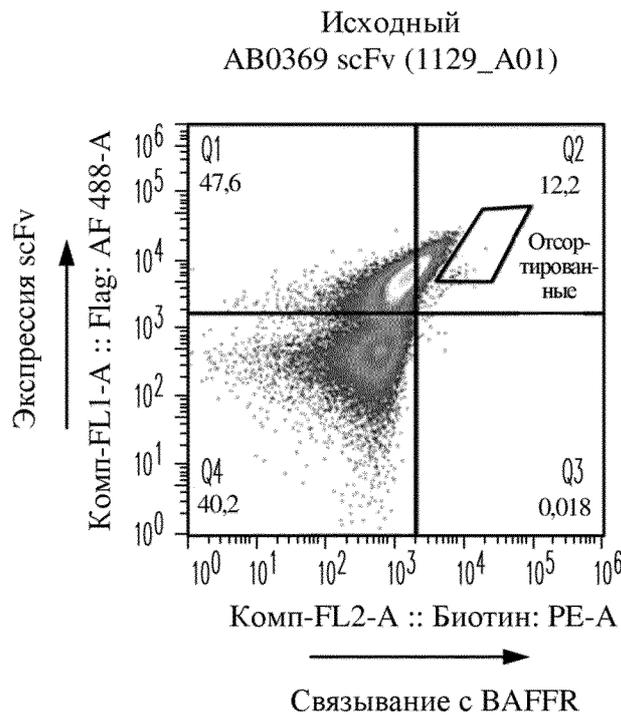
Фиг. 15В



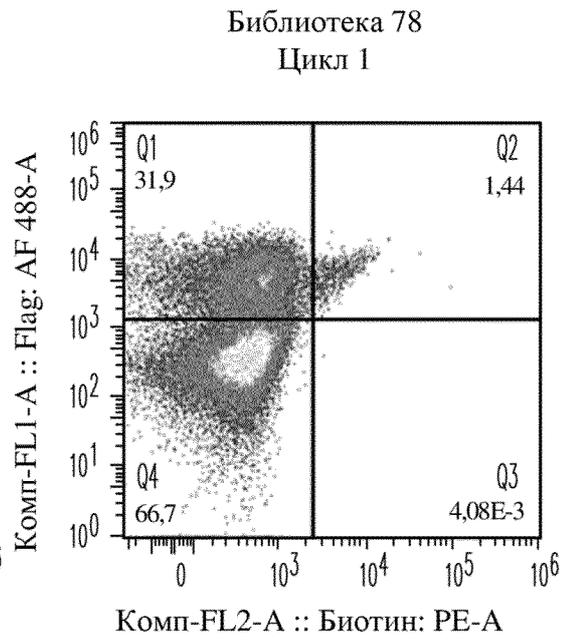
Фиг. 15С



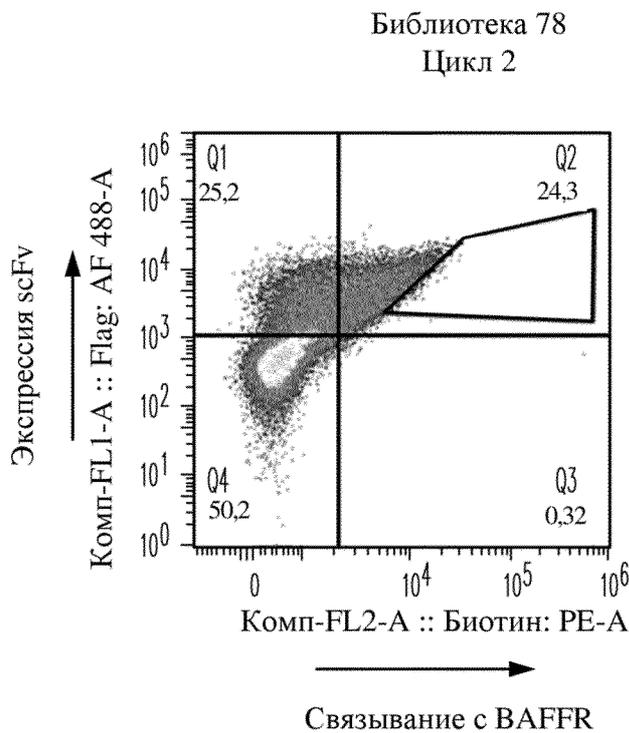
Фиг. 16



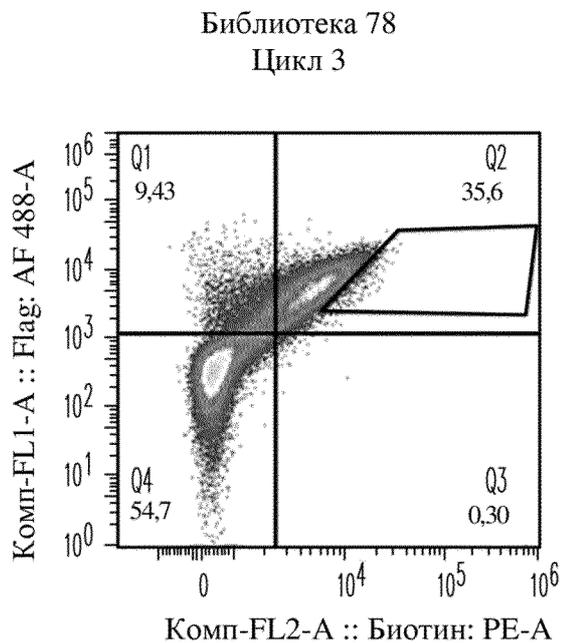
Фиг. 17А



Фиг. 17В

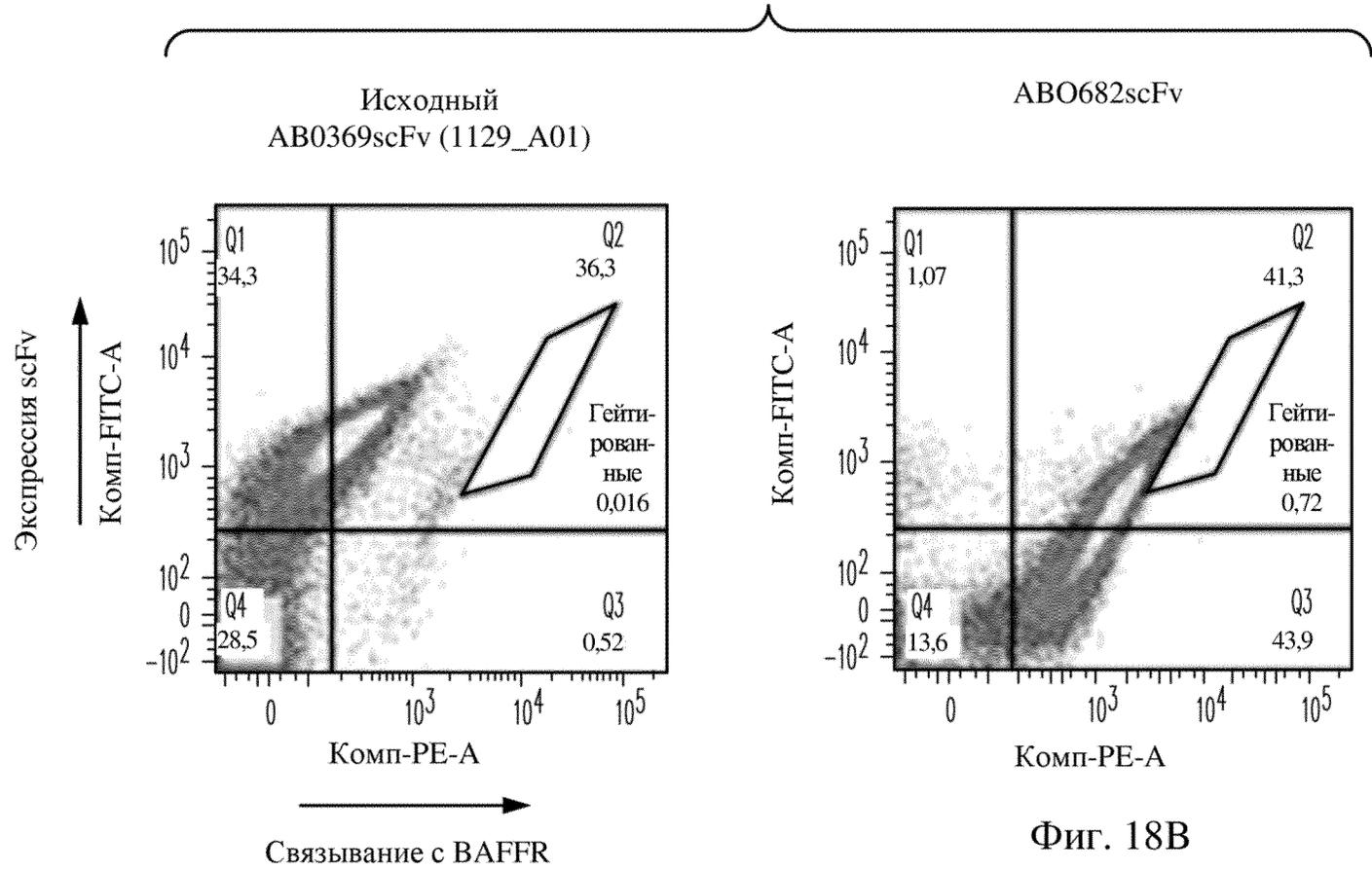


Фиг. 17С



Фиг. 17D

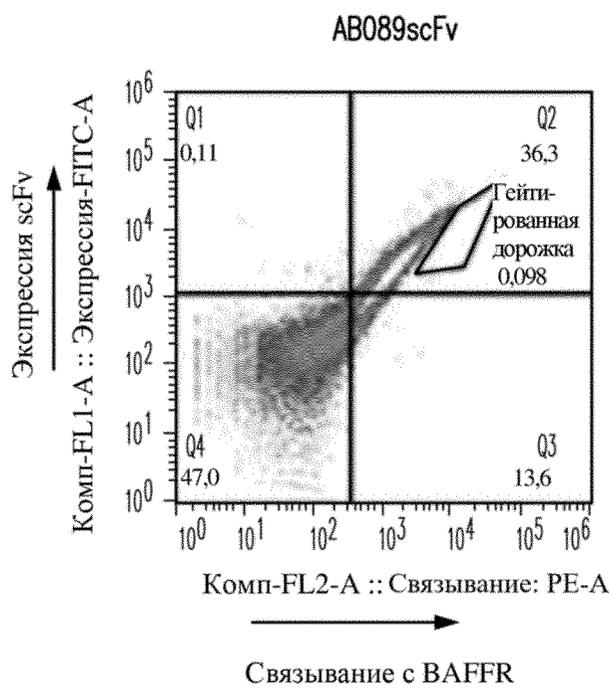
Перед коррекцией потенциальных участков неблагоприятных модификаций



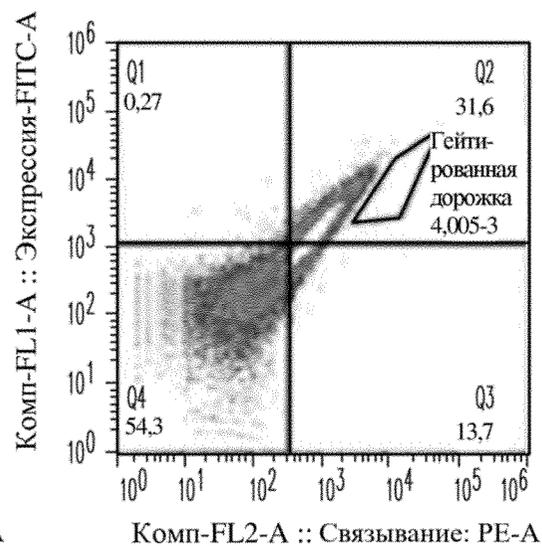
Фиг. 18А

Фиг. 18В

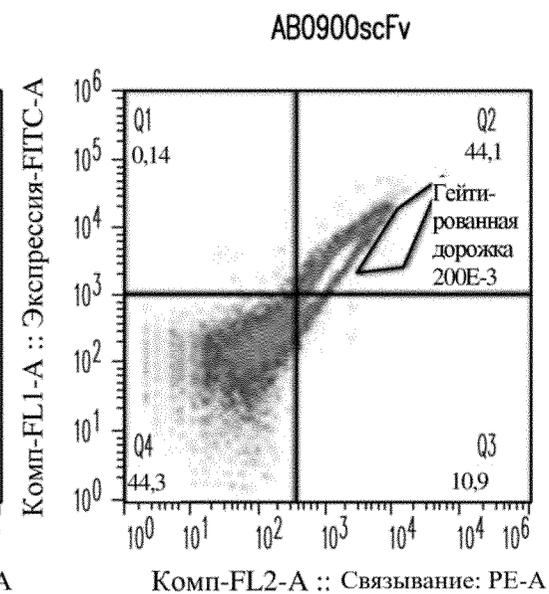
После коррекции потенциальных участков неблагоприятных модификаций



Фиг. 18С

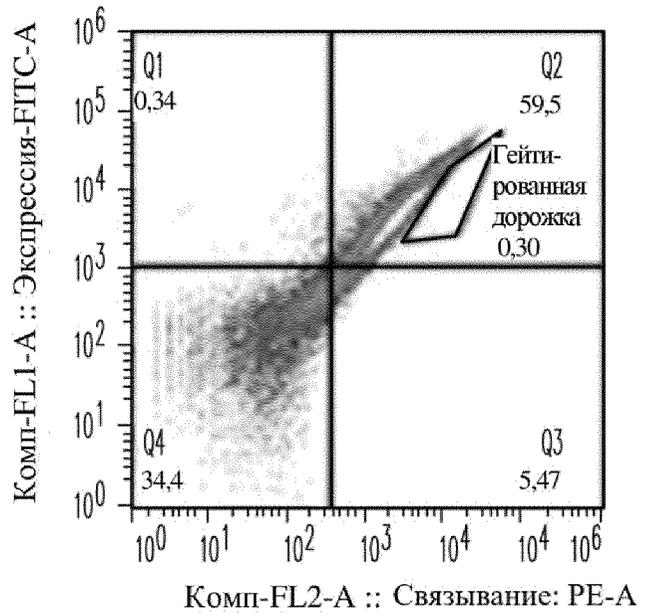


Фиг. 18D

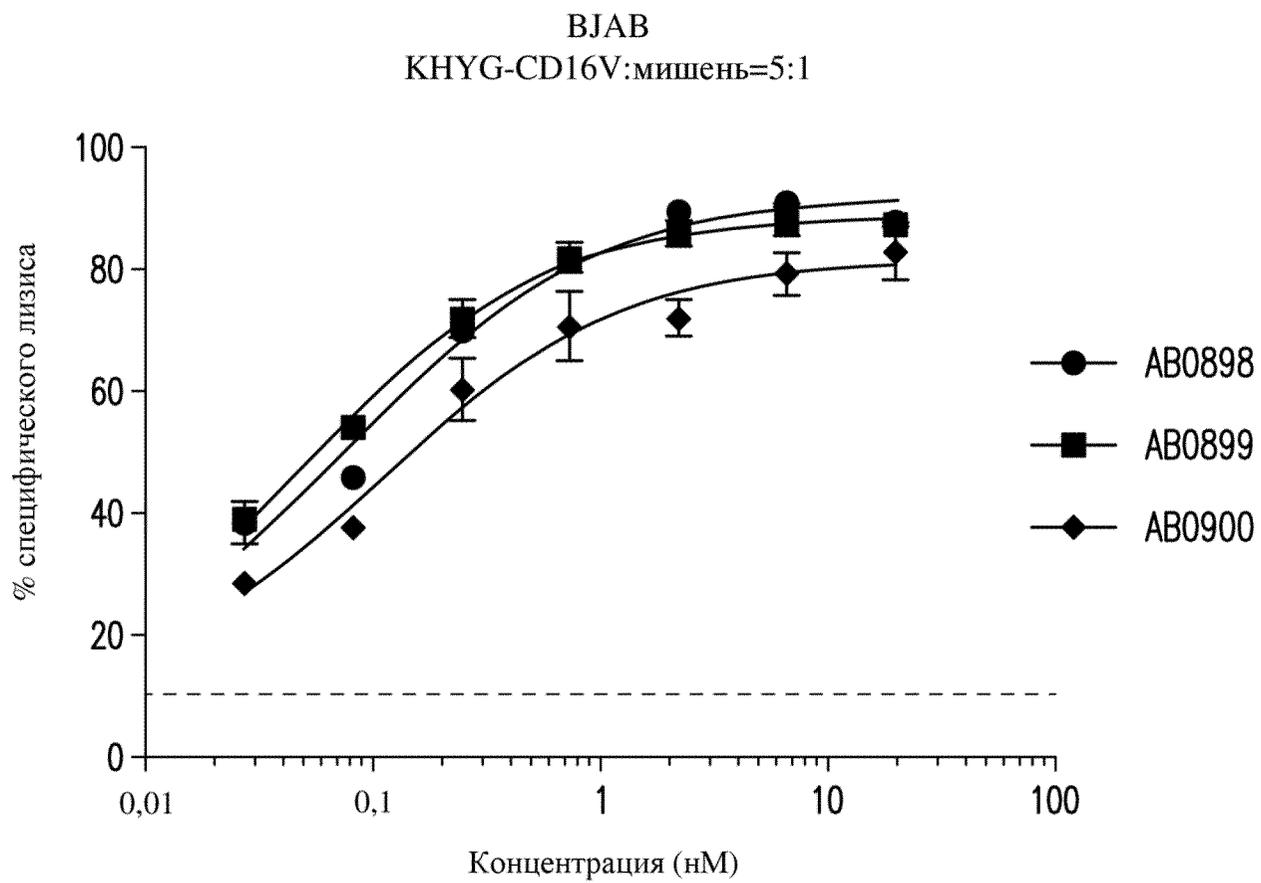


Фиг. 18E

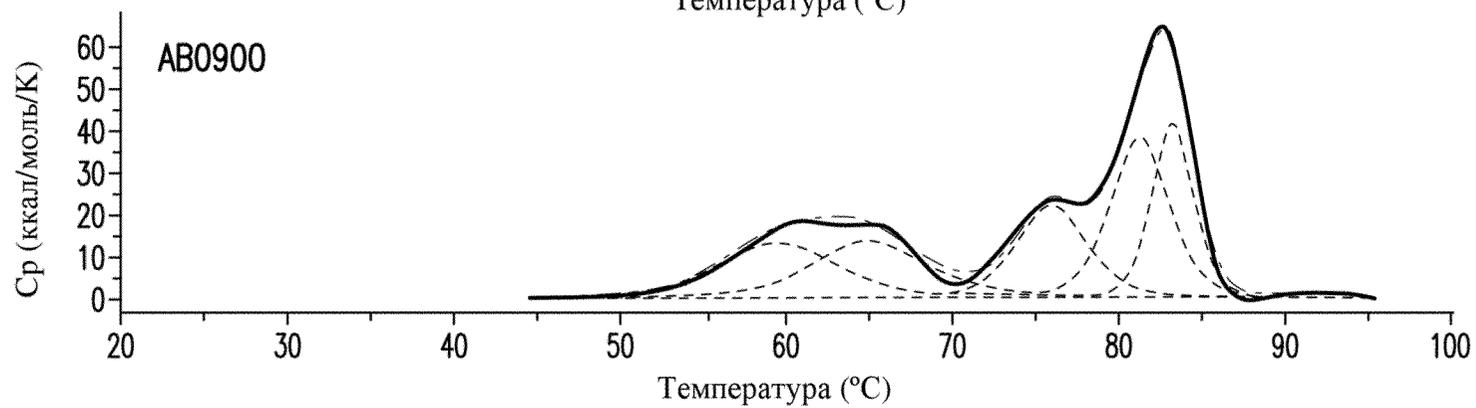
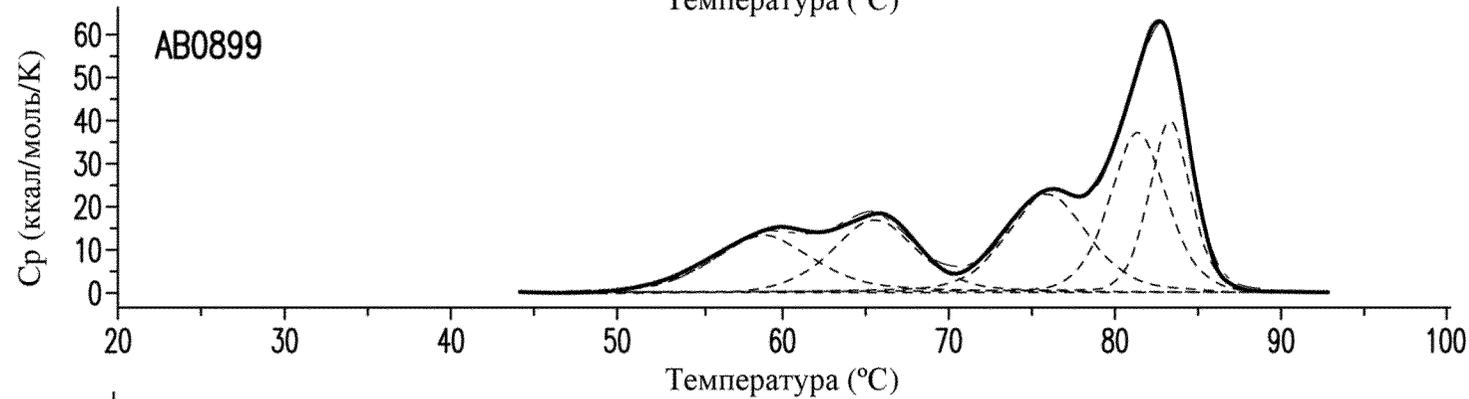
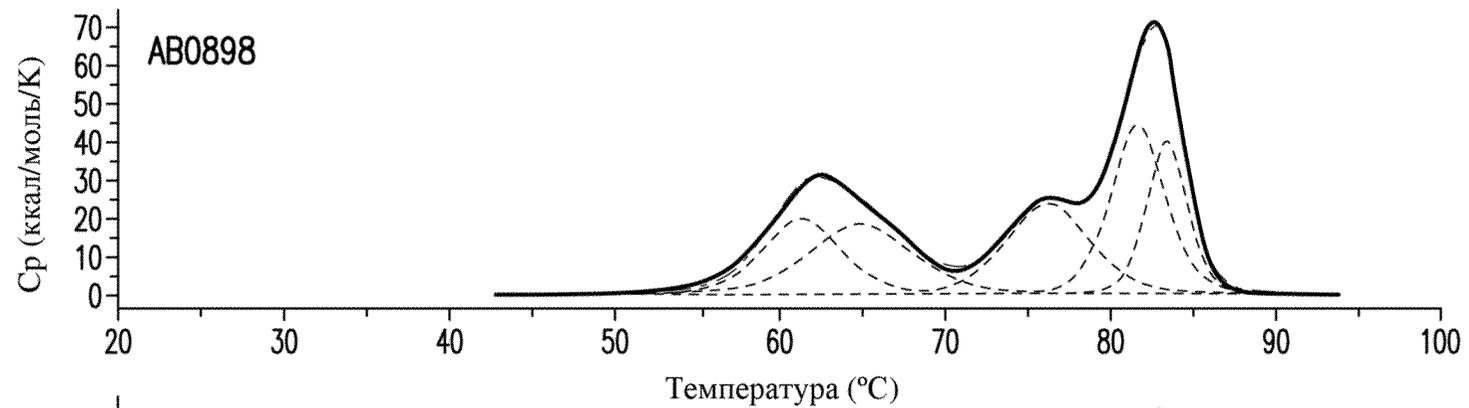
Сравнительный  
scFv на основе ианалумаба



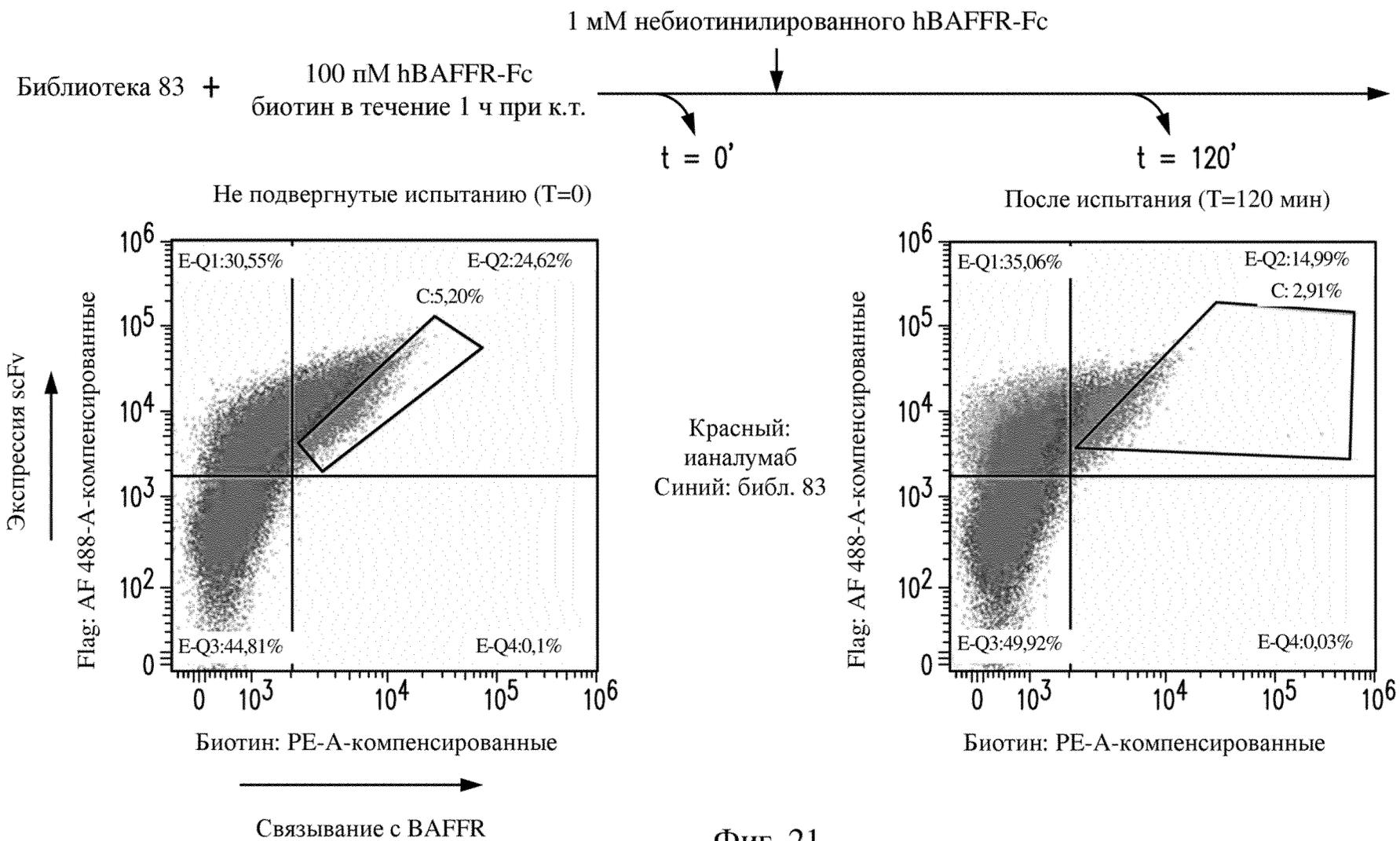
Фиг. 18F



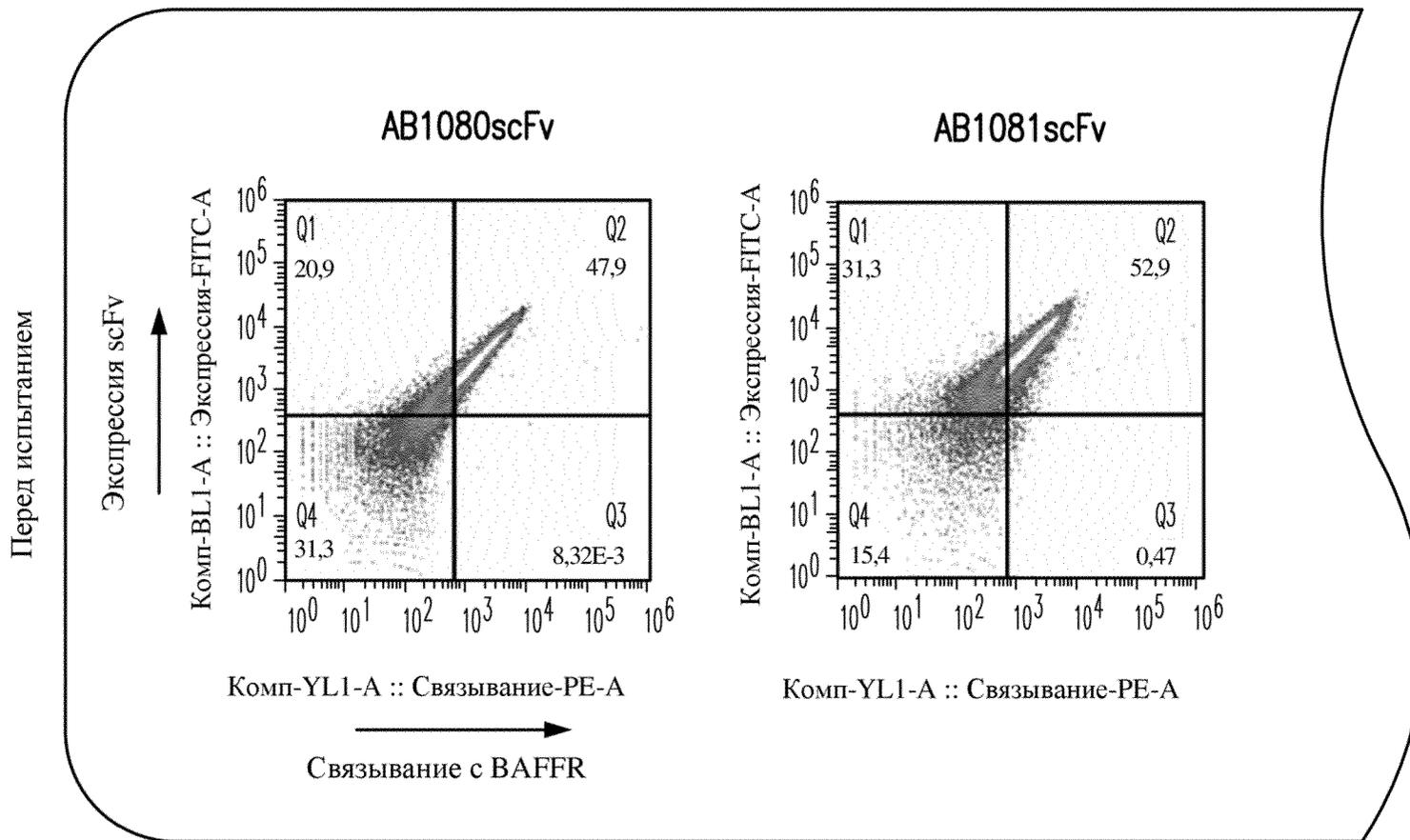
Фиг. 19



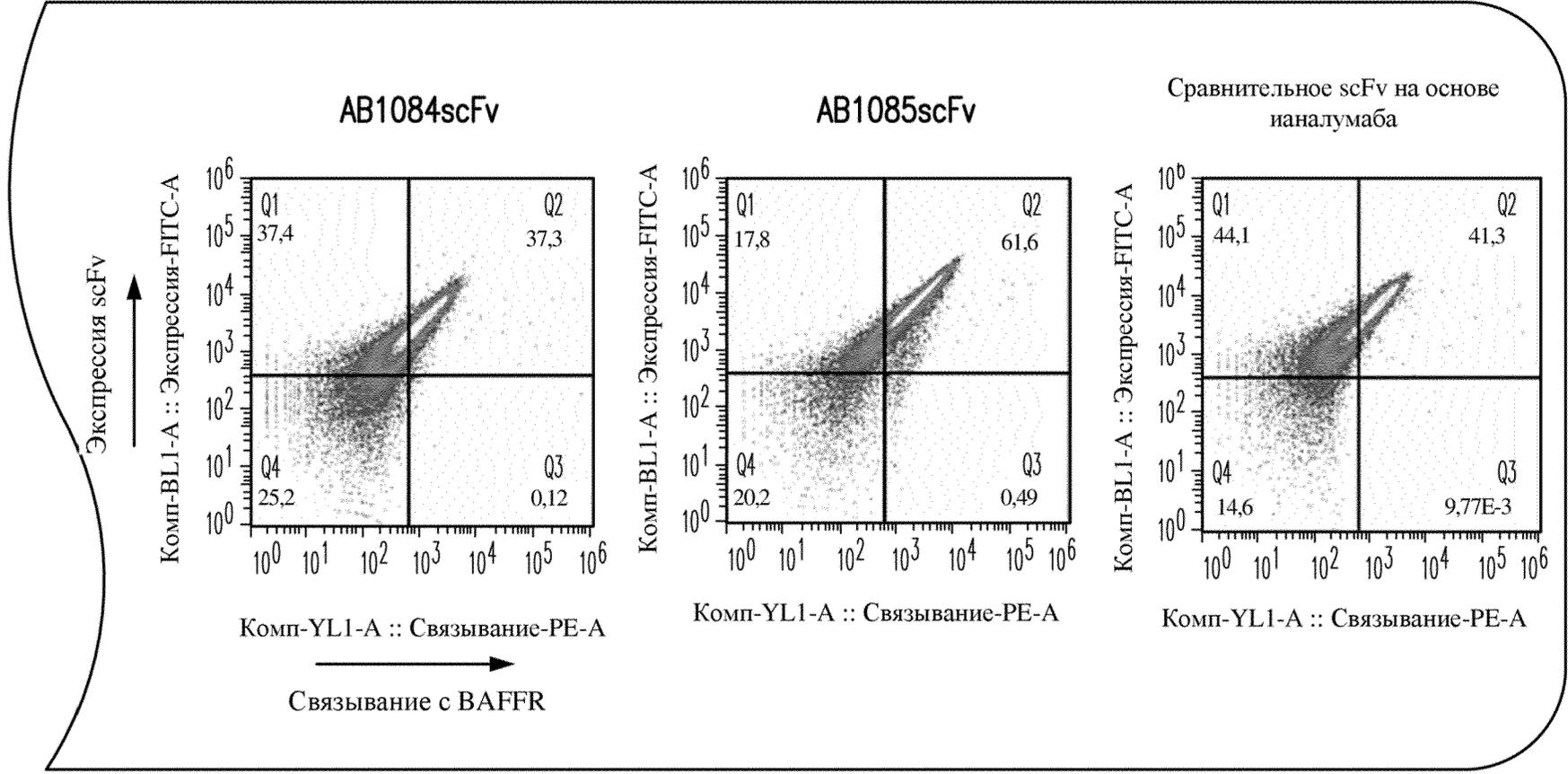
Фиг. 20



Фиг. 21



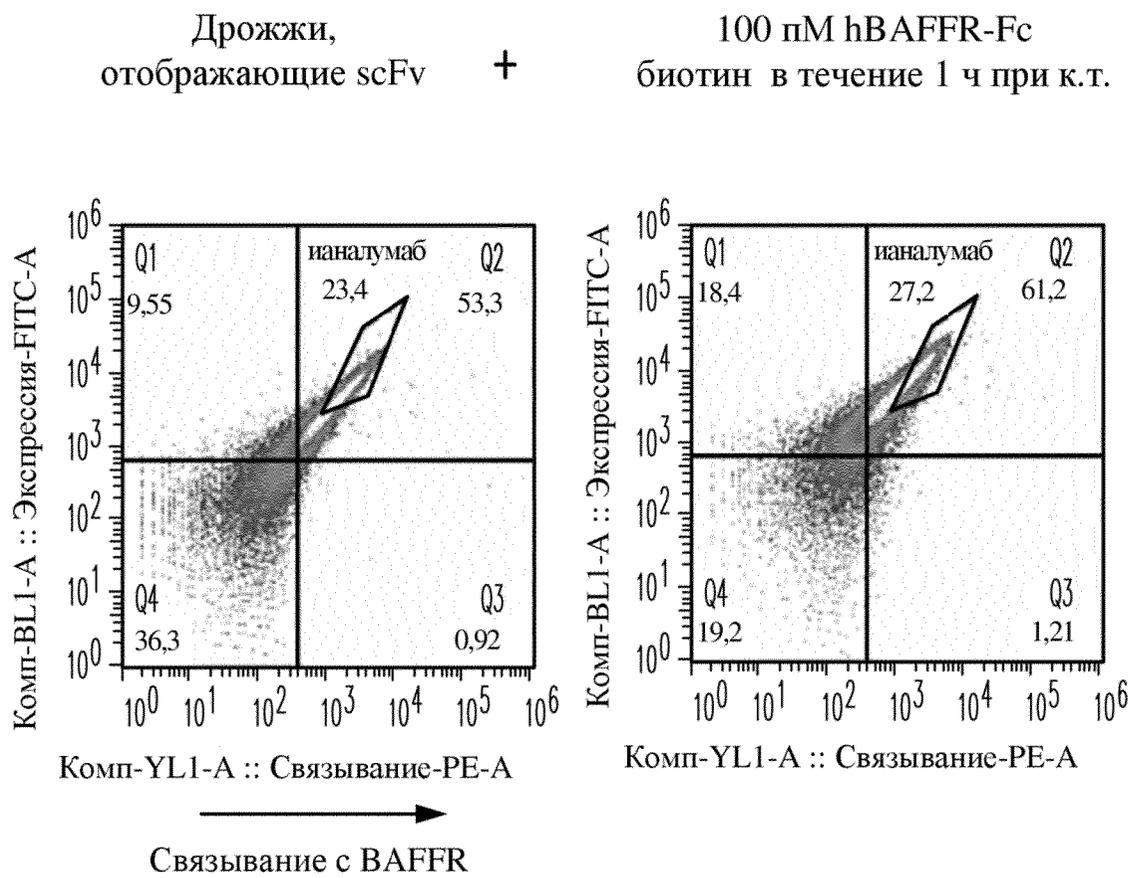
Фиг. 22



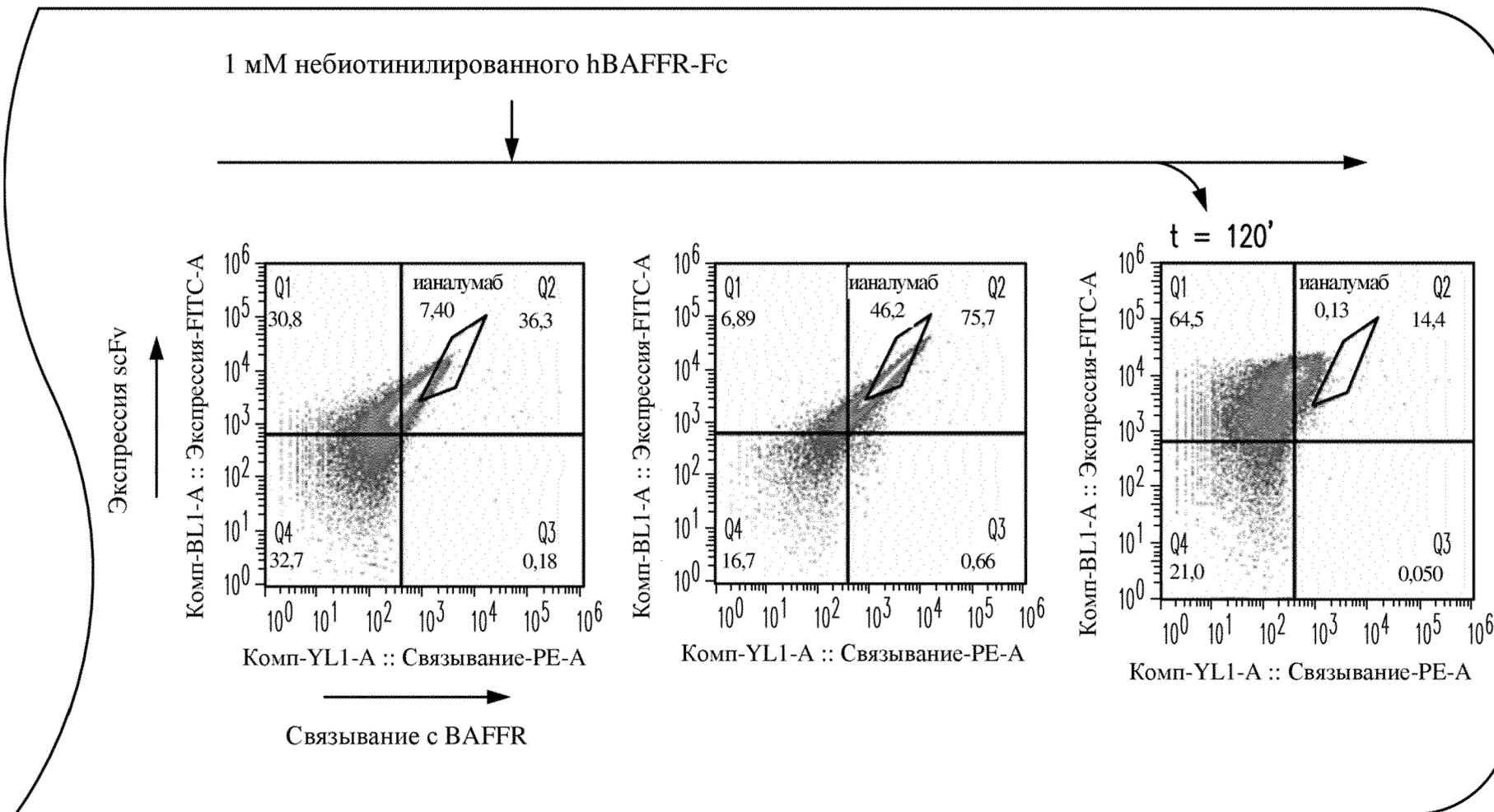
Фиг. 22 (продолж.)

После испытания

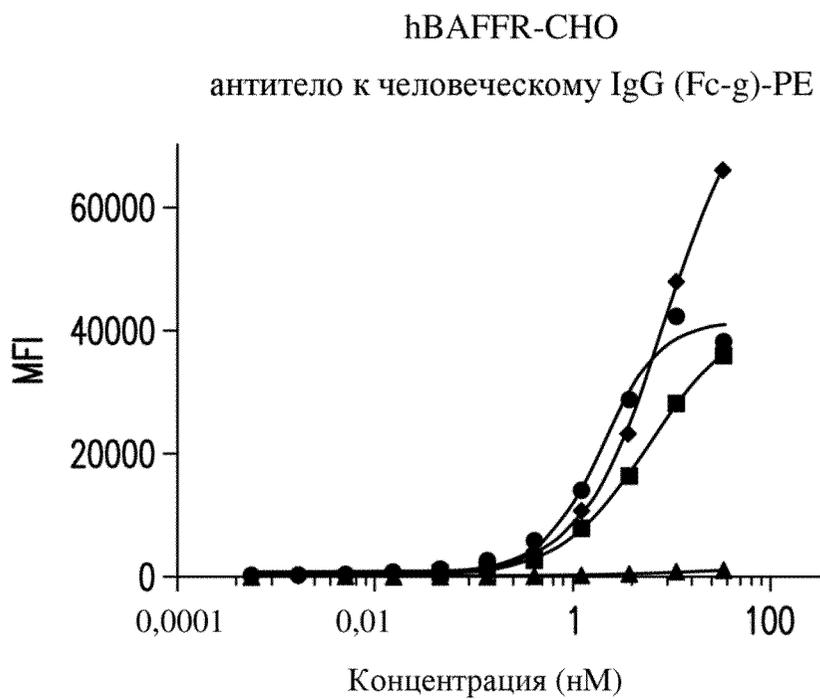
↑  
Экспрессия scFv



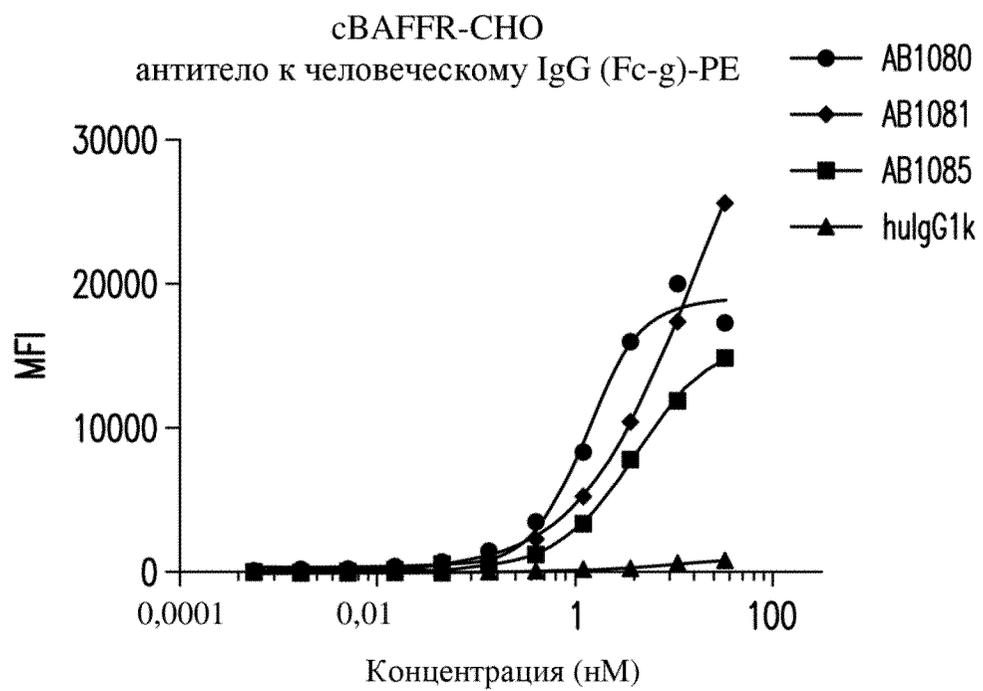
Фиг. 22 (продолж.)



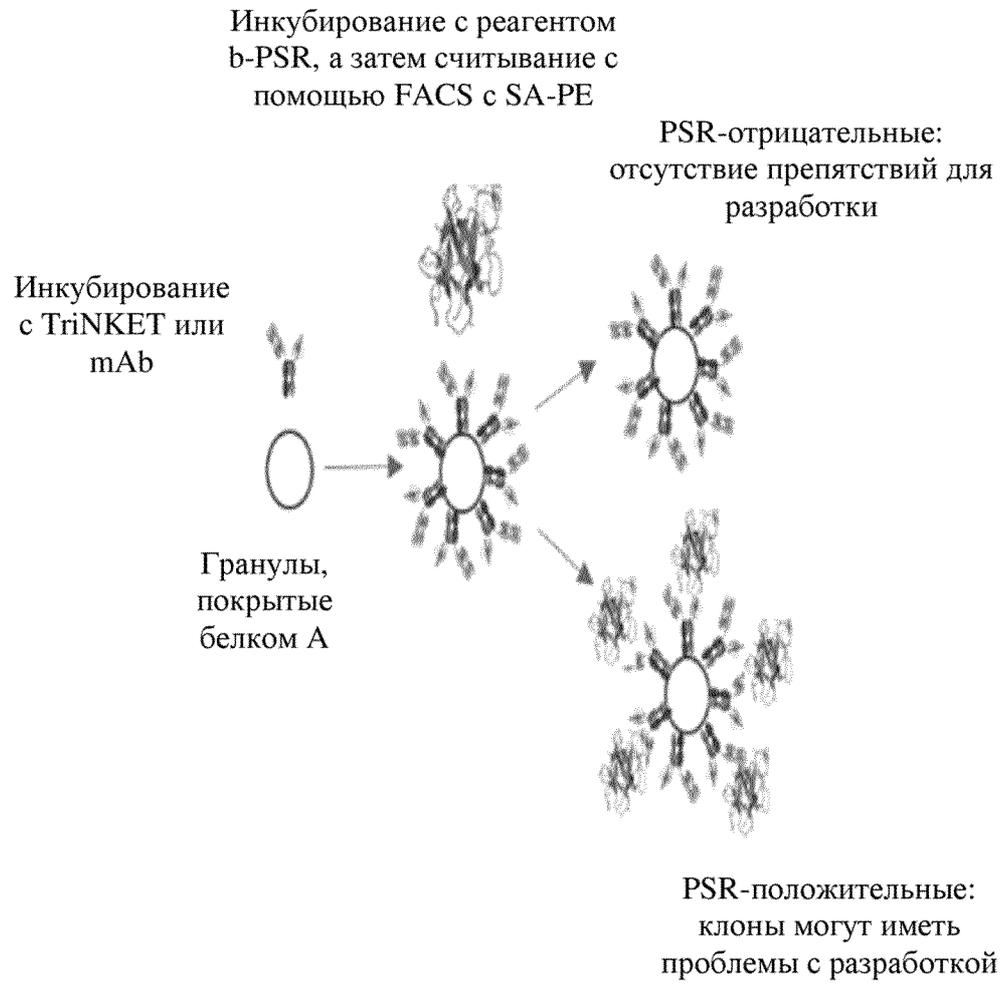
Фиг. 22 (продолж.)



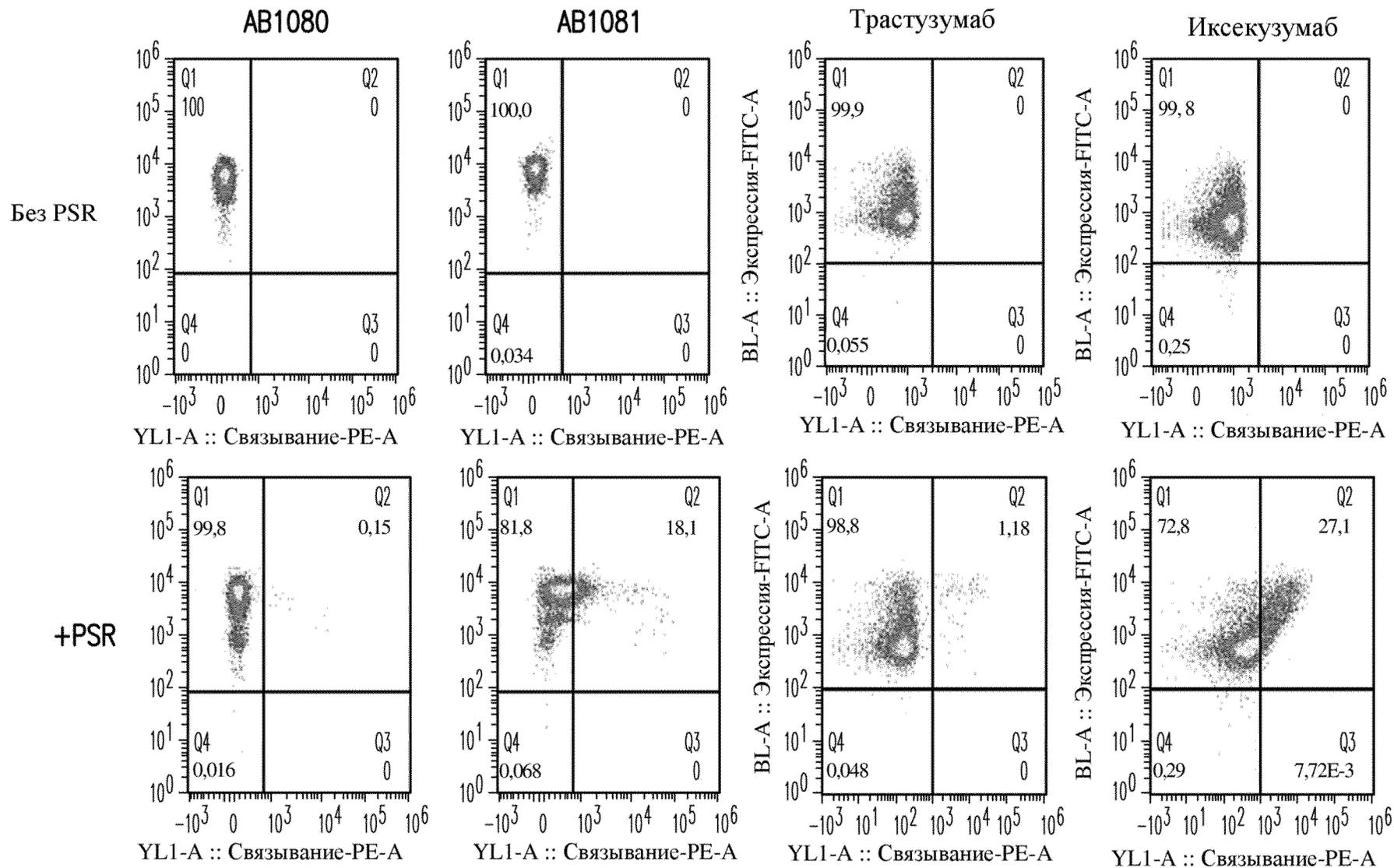
Фиг. 23А



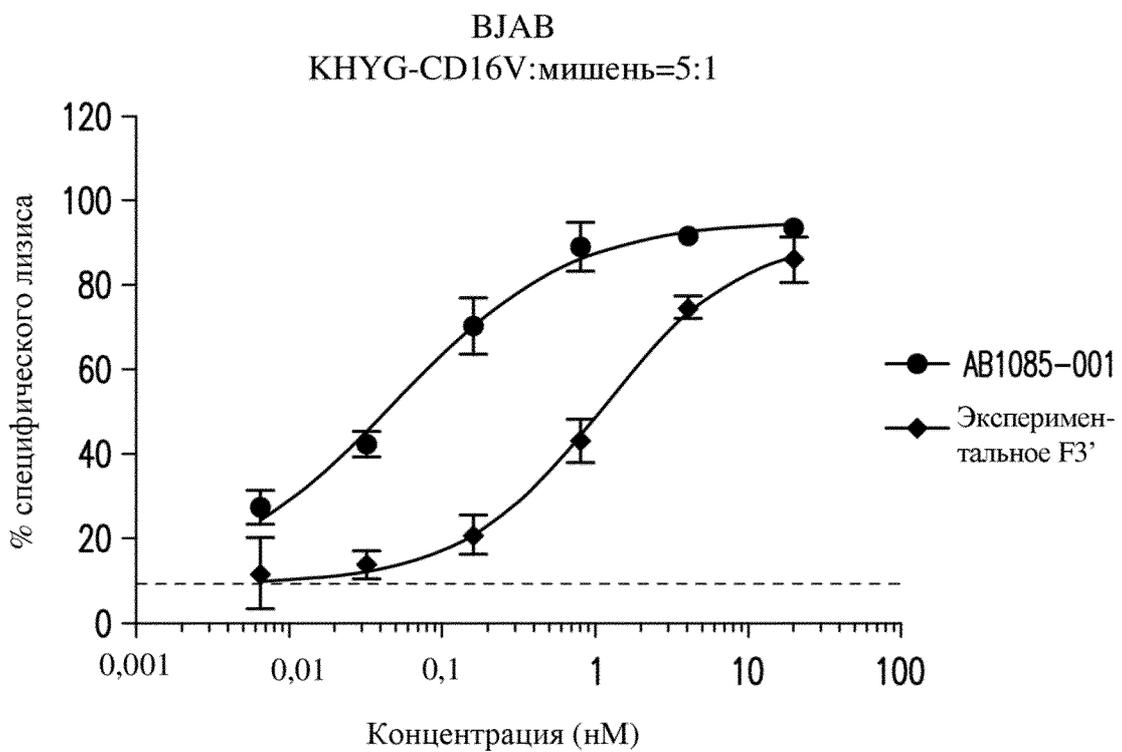
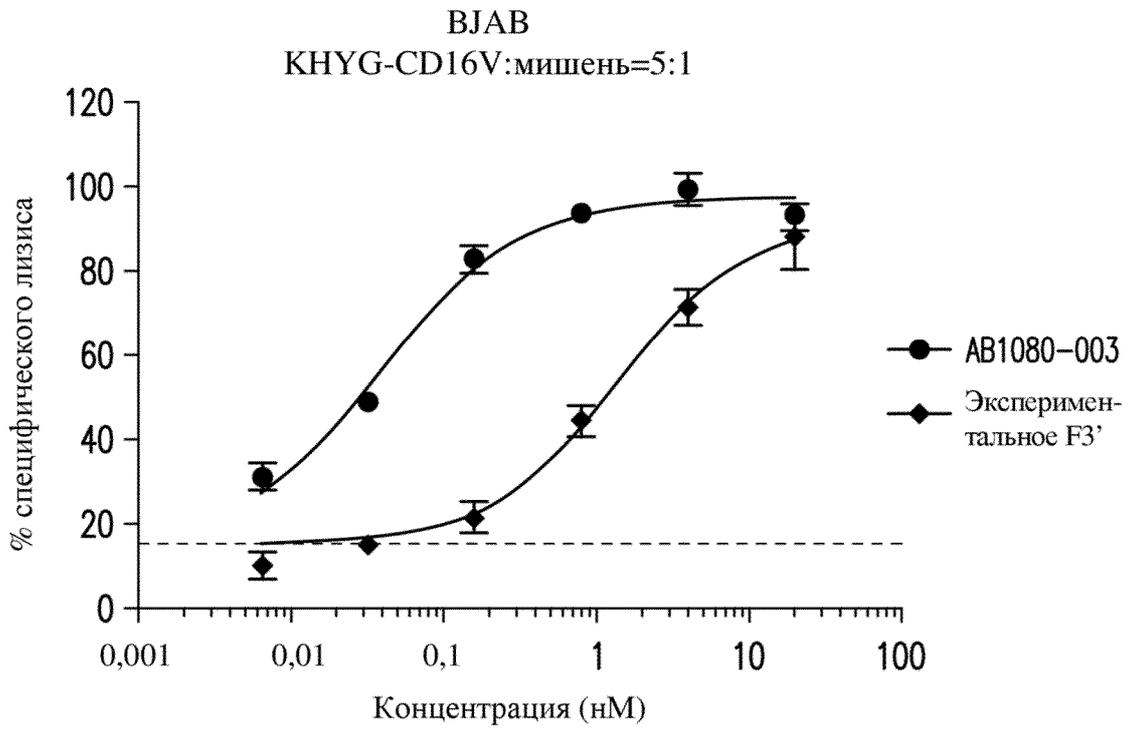
Фиг. 23В

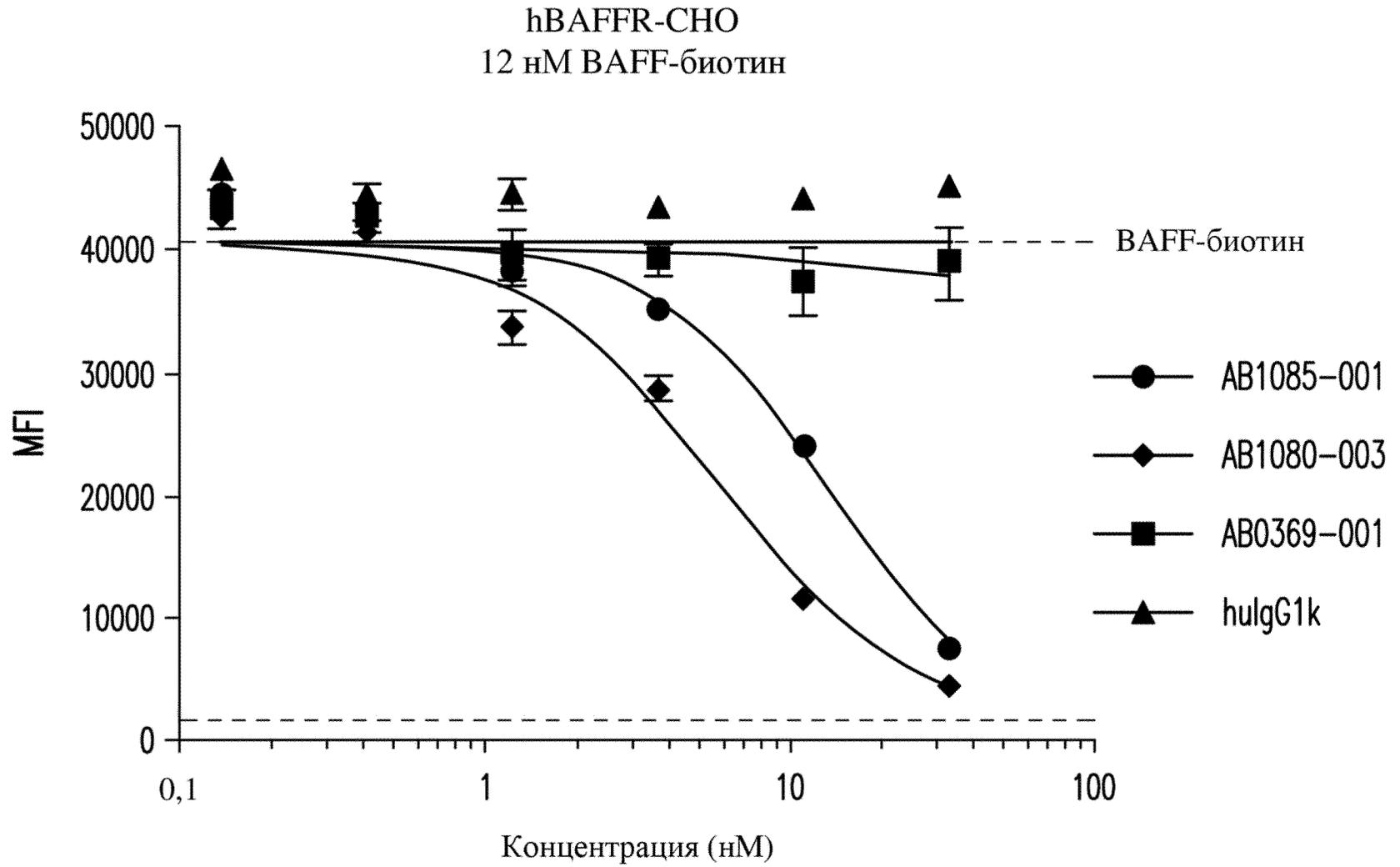


Фиг. 24А

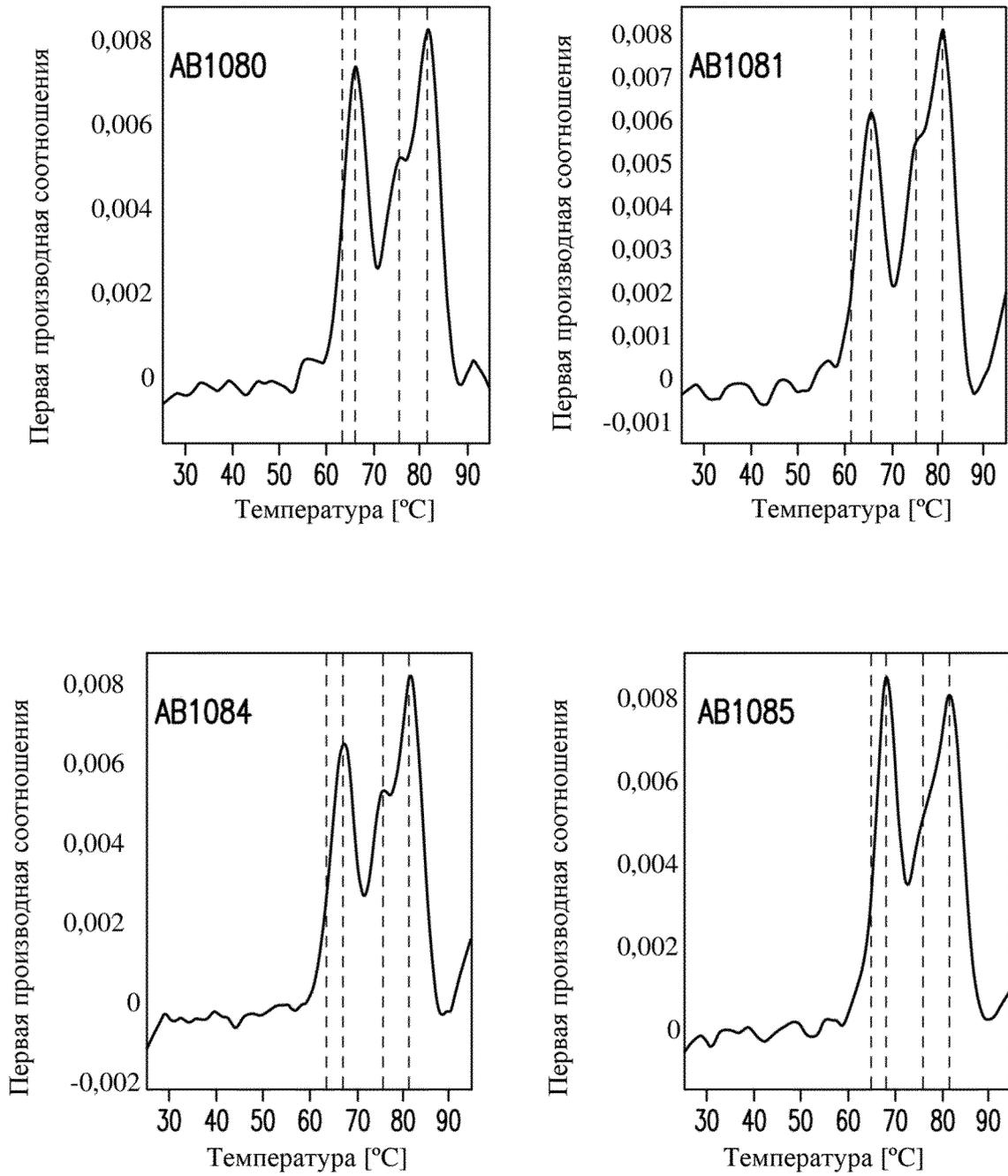


Фиг. 24В

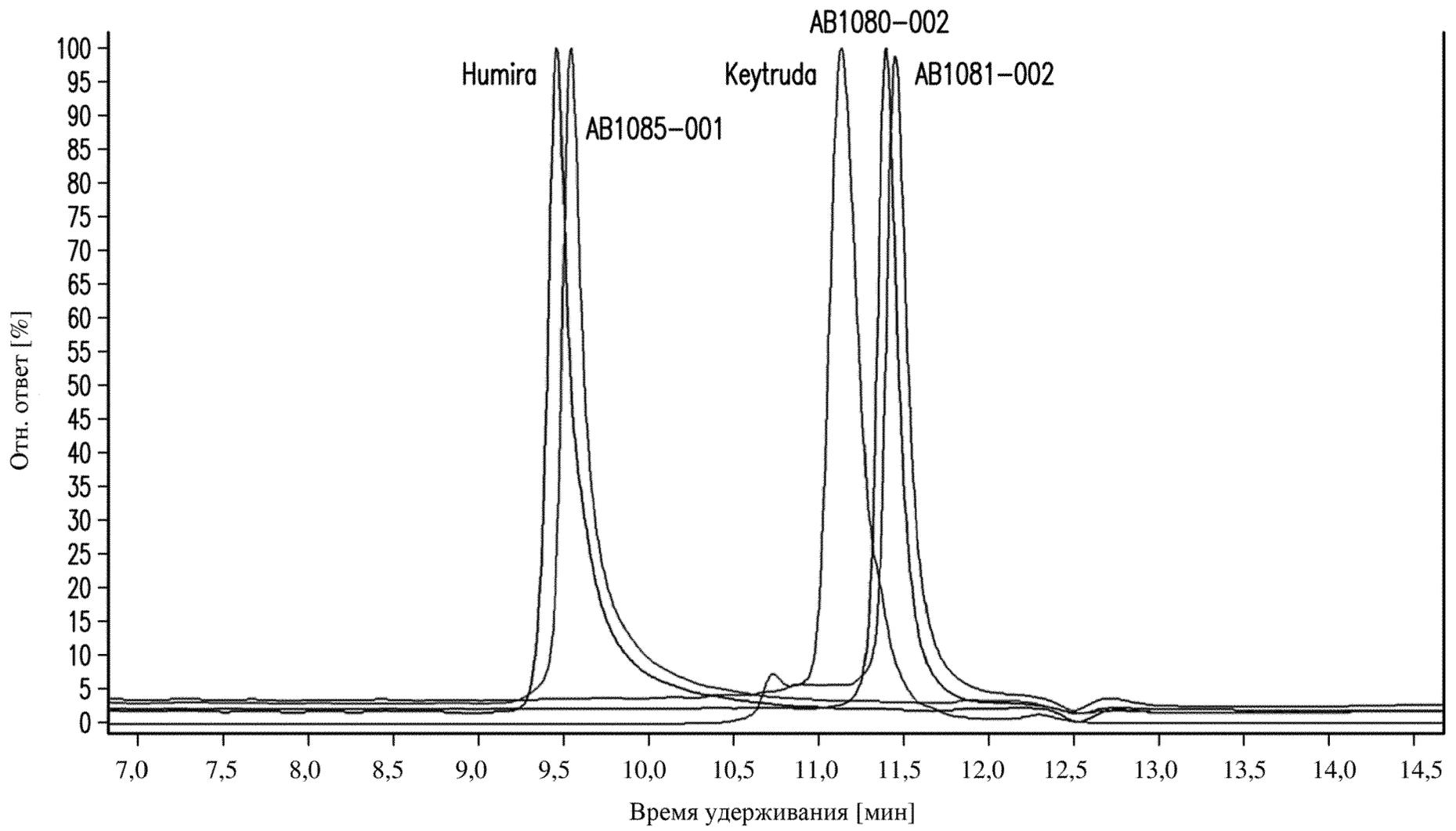




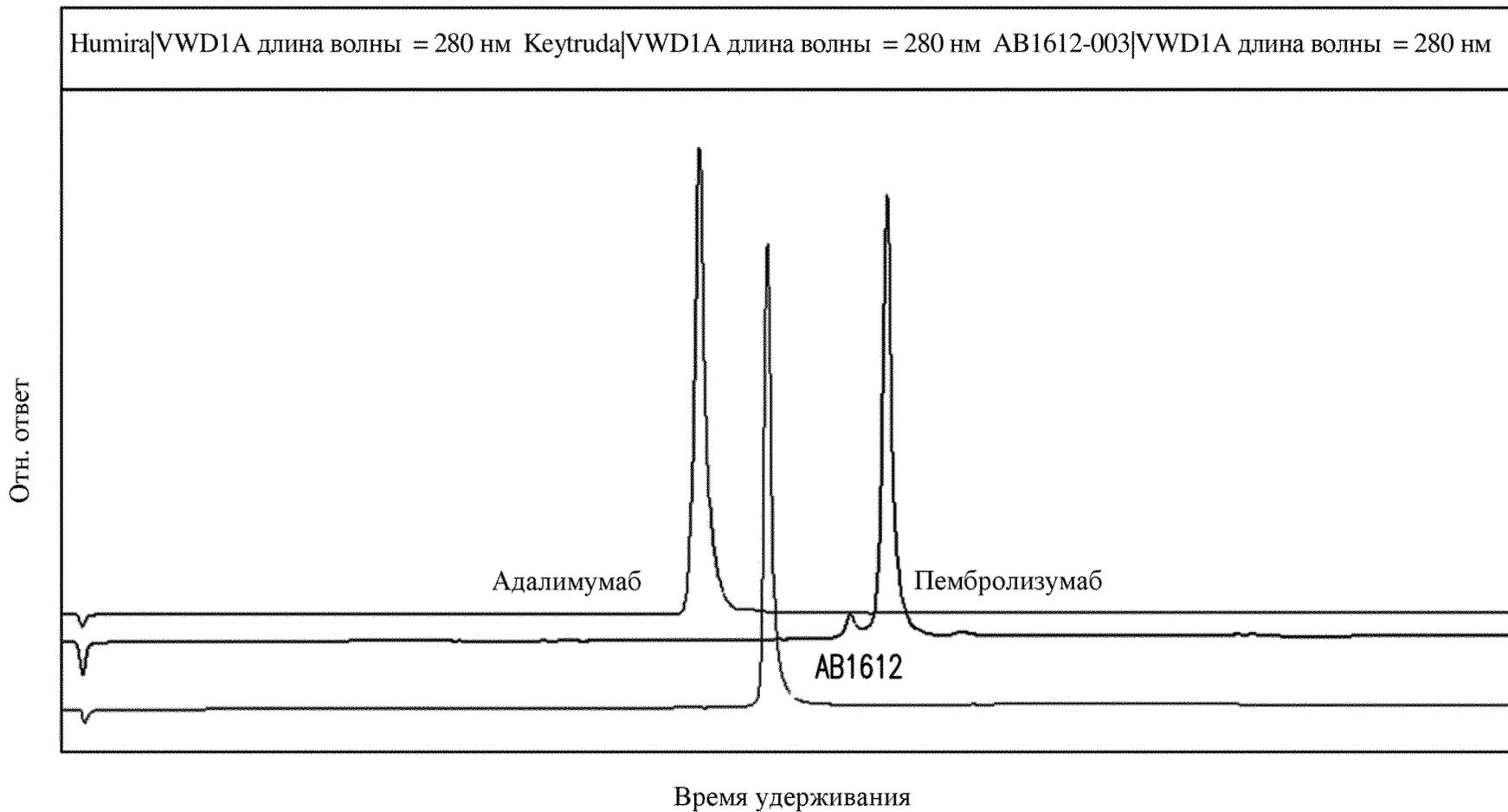
Фиг. 26



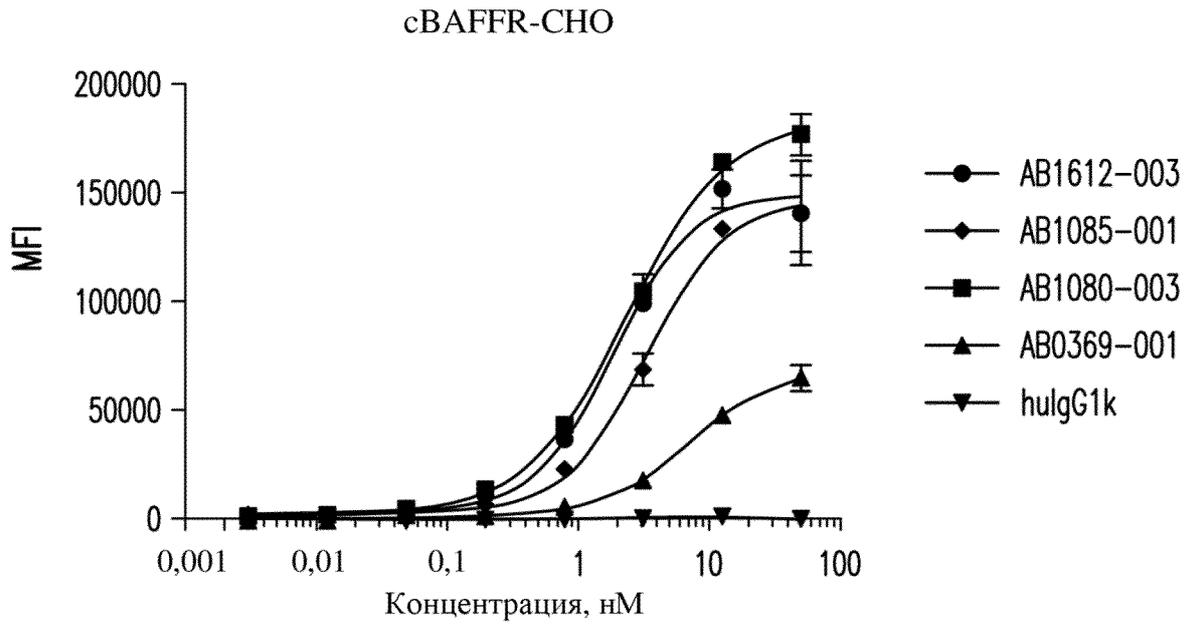
Фиг. 27



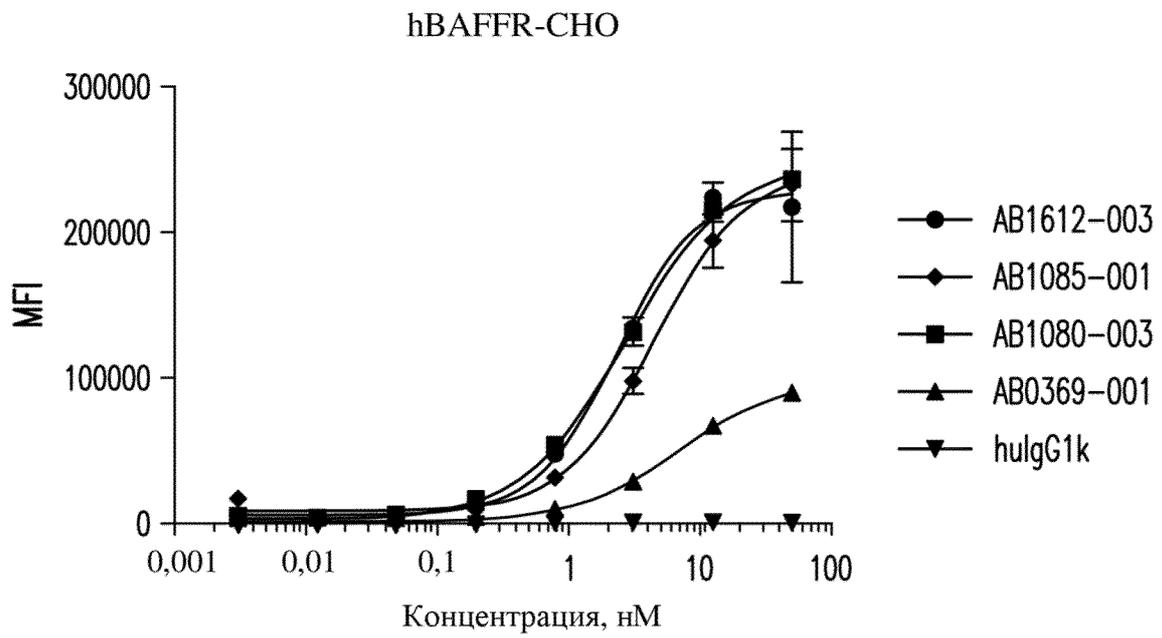
Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30А



Фиг. 30В