

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490524** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.05.31

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

(22) Дата подачи заявки
2018.10.12

(54) **АНТИТЕЛА, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА
И БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/572,468; 62/577,140; 62/613,358;
62/666,065; 62/731,622**

(32) **2017.10.14; 2017.10.25; 2018.01.03;
2018.05.02; 2018.09.14**

(33) **US**

(62) **202090929; 2018.10.12**

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

(72) Изобретатель:

**Бустани Лейла Мери, Ла Порт
Шери Л., Ирвинг Брайан А., Фландез
Джинн Грейс (US)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина
Д.В., Алексеев В.В., Буре Н.Н. (RU)**

(57) В данном документе представлены антитела, активируемые антитела (АА), биспецифические антитела и биспецифические активируемые антитела (ВАА). Также в данном документе представлены способы получения и способы применения таких антител, АА, биспецифических антител и ВАА.

A2

202490524

202490524

A2

АНТИТЕЛА, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА И БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/572 468, поданной 14 октября 2017 г.; предварительной заявке США № 62/577 140, поданной 25 октября 2017 г.; предварительной заявке США № 62/613 358, поданной 3 января 2018 г.; предварительной заявке США № 62/666 065, поданной 2 мая 2018 г.; и предварительной заявке США № 62/731 622, поданной 14 сентября 2018 г., содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] В данном документе представлены антитела, активируемые антитела (АА), биспецифические антитела и биспецифические активируемые антитела (ВАА). Также в данном документе представлены способы получения и способы применения таких антител, АА, биспецифических антител и ВАА.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] «Перечень последовательностей», представленный в электронном виде одновременно с данным документом в соответствии со статьей 37 Кодекса Федеральных Законов США (С.F.R.) § 1.821 в машиночитаемой форме (CRF) посредством EFS-Web в виде файла с именем CYTX-045-US SEQ LIST 10-12-18_ST25.txt, включен в данный документ посредством ссылки. Электронная копия перечня последовательностей была создана 12.10.18, размер на диске составляет 440 килобайт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Терапия на основе антител доказала свою эффективность для лечения ряда заболеваний, но в некоторых случаях токсичность из-за обширной экспрессии мишени ограничивает их терапевтическую эффективность. Кроме того, основанные на антителах терапевтические средства продемонстрировали другие ограничения, такие как быстрое выведение из кровотока после введения.

[0005] В области низкомолекулярной терапии были разработаны стратегии для обеспечения пролекарств активного химического вещества. Такие пролекарства вводят в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство *in vivo* метаболизируется в активное соединение. Такие стратегии в отношении пролекарств могут обеспечить повышенную селективность лекарственного средства в отношении его предполагаемой цели и уменьшить побочные эффекты.

[0006] Соответственно, в данной области существует постоянная потребность в основанных на антителах терапевтических средствах в отношении антител, имитирующих желательные характеристики низкомолекулярного пролекарства.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В данном документе представлены антитела, биспецифические антитела, активируемые антитела и биспецифические активируемые антитела, способы их получения и способы их применения. Они находят применение в терапии и диагностике. Активируемые антитела и биспецифические активируемые антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для уменьшения повреждения здоровой ткани, обычно вызванного связыванием антител с их мишенями на здоровой ткани так же, как и на больной ткани.

[0008] Соответственно, в одном аспекте в настоящем документе представлены биспецифические активируемые антитела (БАА), причем указанные БАА при активации специфически связываются с двумя мишенями и имеет следующую структуру:

- a) антитело IgG (AB1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем AB1 содержит:
 - a. две тяжелые цепи (AB1 HC) и две легкие цепи (AB1 LC); и
 - b. первый маскирующий фрагмент (MM1), связанный с первым расщепляемым фрагментом (CM1) с образованием конструкции MM1-CM1, при этом карбоксильный конец конструкции MM1-CM1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи AB1, причем
 - c. MM1 ингибирует связывание AB1 с его мишенью; и
 - d. CM1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,
- b) два scFv (AB2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждое AB2 содержит:

- a. вариабельную область легкой цепи, связанную с вариабельной областью тяжелой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и
 - b. второй маскирующий фрагмент (ММ2), связанный со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2) с образованием конструкции ММ2-СМ2, причем карбоксильный конец конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, при этом
 - c. ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и
 - d. СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,
- с) и причем ВАА имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:
- a. ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;
 - b. ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7;
 - c. АВ2 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; и
 - d. АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом ЕU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0009] В некоторых вариантах осуществления ВАА, представленные в настоящем документе, содержат:

Биспецифическое активируемое антитело (ВАА), причем указанное ВАА при активации специфически связывается с двумя мишенями и имеет следующую структуру:

- a. антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем АВ1 содержит две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и при этом АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, причем карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, при этом ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,

- b. два scFv (каждый АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждый АВ2 содержит переменную область легкой цепи, связанную с переменной областью тяжелой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и причем каждый АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2), с образованием конструкции ММ2-СМ2, при этом карбоксильный конец каждой конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, причем
- ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и
 - СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,
- и причем ВАА имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:
- i. ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;
 - ii. ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7;
 - iii. АВ2 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; и
 - iv. АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0010] В некоторых вариантах осуществления ВАА содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АВ1 связывает опухолевую мишень, а АВ2 связывает мишень иммунного эффектора. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой активирующее Т-клетки (ТСВ) биспецифическое АА (ТСВАА). В некоторых вариантах осуществления АВ1 связывает EGFR и АВ2 связывает CD3. В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах

осуществления ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления СМ такого СМ содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления СМ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления СМ2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено ВАА С1106, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено ВАА С1107, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено ВАА С1079, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено ВАА С1090, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено ВАА С1135, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено ВАА С1136, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1. В некоторых вариантах осуществления АВ1 содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления АВ1 содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления АВ1 содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления АВ1 содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в положении N297. В некоторых вариантах осуществления АВ1 содержит аминокислотные замены L234F, L235E, P331S и N297Q. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь АВ1 содержит любую из SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, приведенные в таблице 6.

[0011] В другом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифическому активируемому антителу (ВАА), содержащему:

- а) антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем АВ1 содержит:
- i. две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и
 - ii. первый маскирующий фрагмент (ММ1), связанный с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, при этом карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, причем
- б) два scFv (АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждое АВ2 содержит:
- i. переменную область тяжелой цепи, связанную с переменной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и
 - ii. второй маскирующий фрагмент (ММ2), связанный со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2) с образованием конструкции ММ2-СМ2, причем карбоксильный конец конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, при этом

ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и

СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,

ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и

СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

и причем АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления первая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9, а вторая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0012] В некоторых вариантах осуществления ВАА, представленные в настоящем документе, содержат:

а) биспецифическое активируемое антитело (ВАА), содержащее:

i) антитело IgG (AB1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем AB1 содержит две тяжелые цепи (AB1 HC) и две легкие цепи (AB1 LC); и при этом AB1 связан с первым маскирующим фрагментом (MM1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (CM1) с образованием конструкции MM1-CM1, причем карбоксильный конец конструкции MM1-CM1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи AB1, при этом

MM1 ингибирует связывание AB1 с его мишенью; и

CM1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,

ii) два scFv (каждый AB2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждый AB2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, связанную с вариабельной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого AB2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей AB1; и причем каждый AB2 связан со вторым маскирующим фрагментом (MM2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (CM2), с образованием конструкции MM2-CM2, при этом карбоксильный конец каждой конструкции MM2-CM2 связан с аминоконцом каждого AB2, причем

MM2 ингибирует связывание AB2 с его мишенью; и

CM2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

и причем AB1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления первая мишень выбирается из группы, состоящей

из мишеней, представленных в таблице 9, а вторая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0013] В другом аспекте настоящее изобретение относится к активируемому антителу (АА), содержащему: (а) антитело (АВ), которое специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), причем АВ представляет собой антитело IgG1 и при этом область Fc АВ содержит аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет сниженную эффекторную функцию; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ снижает или ингибирует связывание АВ с EGFR, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, при этом СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой любой один или несколько из L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в положении N297. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит мутацию N297Q. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены L234F, L235E, P331S и N297Q. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 4; В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой часть ВАА.

[0014] В другом аспекте настоящее изобретение относится к активируемому антителу (АА), содержащему: (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR); (b)

маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с EGFR, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, и при этом ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит субстрат, расщепляемый сериновой протеазой или MMP. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18–56. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой часть ВАА.

[0015] В другом аспекте настоящее изобретение относится к активируемому антителу (АА), содержащему:

[0016] (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3, причем антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с CD3, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, при этом СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и

вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой часть ВАА.

[0017] В другом аспекте настоящее изобретение относится к активируемому антителу (АА), содержащему: (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эпсилон-цепью CD3; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с CD3, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и (b) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит субстрат, расщепляемый сериновой протеазой или MMP. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18–56. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой MMP. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой сериновую протеазу. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой часть ВАА.

[0018] В другом аспекте настоящее изобретение относится к активируемому антителу (АА), содержащему: (а) антитело (АВ), которое специфически связывается с мишенью, причем антитело представляет собой антитело IgG1 и при этом область Fc антитела содержит аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет сниженную эффекторную функцию; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ снижает или ингибирует связывание АВ с мишенью, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и (c) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, при этом СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых

вариантах осуществления мишень выбрана из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой часть ВАА.

[0019] В другом аспекте в настоящем документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3, причем антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело является частью АА или является частью ВАА.

[0020] В другом аспекте в настоящем документе представлено антитело, которое специфически связывается с EGFR или CD3 (АВ), причем антитело является антителом IgG1 или scFv, связанным с областью Fc, при этом антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что антитело имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых

вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой любой один или несколько из L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в положении N297. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит мутацию N297Q. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены L234F, L235E, P331S и N297Q. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела содержит любую из SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, приведенные в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела содержит любую из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или в котором переменный домен легкой цепи АВ содержит любой из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антитело является частью АА или является частью ВАА.

[0021] В другом аспекте в настоящем документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие любое из описанных выше ВАА, АА и антител и, необязательно, носитель. В другом аспекте в настоящем документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие любое из описанных выше ВАА, АА и антител и носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит дополнительный агент, например дополнительный агент может представлять собой терапевтический агент.

[0022] В другом аспекте в настоящем документе также представлены выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любое из описанных выше ВАА, АА и антител. Также предоставлены векторы, содержащие представленную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW289. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW246. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW307. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW291. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW352. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW246. В

некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты pLW353.

[0023] В другом аспекте в данном документе также представлена клетка, содержащая любой из векторов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена клетка, содержащая pLW289 и pLW246. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена клетка, содержащая pLW307 и pLW291. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена клетка, содержащая pLW352 и pLW246. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена клетка, содержащая pLW353 и pLW246.

[0024] В другом аспекте в настоящем документе представлены способы получения представленных выше антител, АА или ВАА путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела, АА или ВАА, причем клетка содержит соответствующую молекулу нуклеиновой кислоты или векторы, предоставленные в данном документе.

[0025] В другом аспекте в настоящем документе предлагается способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования расстройства или заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества антител/АА/ВАА/фармацевтических композиций, описанных выше, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления расстройство или заболевание включает в себя заболевание клеток, экспрессирующих EGFR. В некоторых вариантах осуществления нарушение или заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак анального канала, базальноклеточный рак, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак тонкой кишки, рак кожи, рак яичка, рак щитовидной железы или рак матки. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой лимфому, например лимфому, ассоциированную с вирусом Эпштейна-Барр, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак кожи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак пищевода. В некоторых вариантах

осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак легкого.

[0026] В другом аспекте в настоящем документе предлагается способ ингибирования ангиогенеза у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества описанных выше антител/АА/ВАА/фармацевтических композиций субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение дополнительного агента. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой терапевтический агент.

[0027] В другом аспекте в настоящем документе представлен способ уменьшения повреждения здоровой ткани, вызванного связыванием антитела с его мишенью на здоровой ткани так же, как и на больной ткани (например, раковой ткани), причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, АА или ВАА, или фармацевтической композиции, содержащей АА или ВАА, при этом указанные АА или ВАА представляют собой АА или ВАА по любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[0028] В другом аспекте в настоящем документе предлагается способ улучшения переносимости лечения антителами, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом (например, субъекту, страдающему раком), АА или ВАА или фармацевтической композиции, содержащей АА или ВАА, причем указанные АА или ВАА представляет собой АА или ВАА по любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[0029] В другом аспекте в настоящем документе представлен способ рекрутирования Т-клеток в опухолевую ткань, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, АА или ВАА или фармацевтической композиции, содержащей АА или ВАА, причем указанные АА или ВАА представляют собой АА или ВАА по любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[0030] В другом аспекте в настоящем документе представлено антитело, АА, ВАА или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства. Лекарственное средство может быть использовано в способе уменьшения повреждения здоровой ткани, вызванного связыванием антитела с его мишенью на здоровой ткани так же, как и на больной ткани. Лекарственное средство может быть использовано для улучшения переносимости лечения антителами.

[0031] В другом аспекте в настоящем документе представлено антитело, АА, ВАА или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления, представленных в

настоящем документе, для использования в способе лечения, ослабления симптома или задержки прогрессирования расстройства или заболевания, причем расстройство или заболевание включает в себя заболевание клеток, экспрессирующих EGFR.

[0032] В другом аспекте в настоящем документе представлено антитело, АА, ВАА или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, для применения в способе лечения рака; причем необязательно рак представляет собой рак анального канала, базальноклеточный рак, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак кости, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак тонкой кишки, плоскоклеточный рак, рак кожи, рак яичка, рак щитовидной железы или рак матки. Применение может включать рекрутинг Т-клеток к опухолевой ткани.

[0033] В другом аспекте в настоящем документе представлено антитело, АА, ВАА или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, для применения в способе, включающем ингибирование ангиогенеза.

[0034] Антитело, АА, ВАА или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, могут быть использованы в способе лечения, включающем введение дополнительного агента; причем необязательно дополнительный агент необязательно представляет собой терапевтический агент.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0035] На фиг. 1А показано, что включение маскирующего пептида CD3 h20GGε в EGFR маскировало значительно сниженное связывание СИ106 и СИ107 ВАА с клетками Jurkat по сравнению с СИ011. Также очевидным является снижение связывания с клетками HT29-luc2 EGFR+ у СИ106 и СИ107 относительно СИ011 (фиг. 1В).

[0036] На фиг. 2А показано, что гибель клеток HT29-luc2 EGFR+ и была дополнительно ослаблена у СИ106 и СИ107 по сравнению с СИ011 и СИ040. На фиг. 2В показано, что обнаруживаемая цитотоксичность не наблюдалось при обработке клеток СИ127 и СИ128, что демонстрирует зависимость нацеливания EGFR для уничтожения клеток. На фиг. 2В также показано более чем 300 000-кратное смещение EC50 антител с двойной маскировкой (то есть ВАА, маскированных в доменах, связывающих мишени как EGFR, так и CD3) СИ106 и СИ107 по отношению к активируемым протеазой биспецифическим антителам (то есть ВАА, активированным обработкой протеазой) act-104 (также

упоминается под названием С1104). На фиг. 2С изображено количество рецепторов EGFR на панели клеточных линий, которая включает НТ29. Приблизительное количество рецепторов EGFR на клетках НТ29 составляло 75 000, что указывает на отсутствие необходимости в высокой плотности антигена для сильной цитотоксичности тестируемых ВАА.

[0037] На фиг. 3А показано, что активация первичных CD8 + Т-клеток была ослаблена С1106 и С1107 по сравнению с С1011 и С1040. На фиг. 3В показано, что антитела с двойной маскировкой имеют сдвинутую кривую доза-ответ активации Т-клеток относительно активируемого протеазой биспецифического антитела act-104, что указывает на то, что маскирование ослабляет активацию Т-клеток.

[0038] На фиг. 4 показан объем опухоли в зависимости от количества дней после начальной дозы лечения, что демонстрирует дозозависимое влияние биспецифических АА С1106 и С1107 с двойной маскировкой на рост ксенотрансплантатных опухолей НТ29-luc2.

[0039] На фиг. 5 показан объем опухоли в зависимости от дней после начальной дозы лечения, что демонстрирует дозозависимое влияние биспецифических АА С1106 и С1107 с двойной маскировкой на рост ксенотрансплантатных опухолей НСТ116.

[0040] На фиг. 6А-6В показано, что EC50 тестируемых активируемых протеазой биспецифических антител с двойной маскировкой сходны при использовании эффекторных клеток человека (6А) и яванского макака (6В). На фиг. 6С-6D показано сходство связывания активированных протеазой антител с двойной маскировкой с Т-клетками человека (6С) и яванского макака (6D).

[0041] На фиг. 7А-7С представлены концентрации АЛТ (7А), АСТ (7В) и общего билирубина (7С) в сыворотке до введения и через 48 часов и 7 дней после введения у яванских макаков, получавших С1106 или С1107.

[0042] На фиг. 8А-8С показано увеличение уровней цитокинов в сыворотке для IL-2 (8А), IL-6 (8В) и IFN-g (8С) у яванских макаков, получавших С1106 или С1107,

[0043] На фиг. 9А-9С изображена активация Т-клеток, измеренная на основании экспрессии CD69 (9А), Ki67 (9В) и PD-1 (9В) в CD4+ Т-клетках у яванских макаков, получавших С1106 или С1107.

[0044] На фиг. 10А-Е представлен график дозозависимого увеличения АСТ через 48 ч после введения дозы (10А), АЛТ через 48 ч после введения дозы (10В), IL-6 через 8 ч после введения дозы (10С), IFNg через 8 ч после введения дозы (10D) и Ki67 через 72 ч после введения дозы (10Е) у яванских макаков, получавших act-104, С1106 или С1107. Кривая доза-ответ для всех параметров у антител с двойной маскировкой была сдвинута,

что указывает на улучшение переносимости и снижение фармакодинамических эффектов по сравнению с активируемым протеазой биспецифическим антителом.

[0045] На фиг. 11А-11С показано сравнение влияния EGFR-связывающего С1107 и не связывающего EGFR С1128 (RSVхCD3) на увеличение общего билирубина (11А), IL-6 (11В) и экспрессирующих PD-1 CD4+ Т-клеток (11С) у яванских макаков, получавших С1107 или С1128.

[0046] На фиг. 12А показаны измерения аффинности CD3-антител v12, v16 и v19 относительно hSP34. На фиг. 12В показана цитотоксичность активированных антител или биспецифических антител с двойной маскировкой на клетках HT29-luc2.

[0047] На фиг. 13 показана расширенная фармакокинетика антитела с двойной маскировкой, С1107, относительно активированного протеазой биспецифического антитела, аст-104.

[0048] На фиг. 14А показана эффективность на модели вмешательства на опухоли HT29-luc2 у мышей NSG с трансплантированными МКПК. Противоопухолевая активность в данном примере коррелирует с чувствительностью к протеазе и расщепляемостью субстрата тестируемых вариантов, причем наиболее эффективным тестируемым вариантом является полностью активированный протеазой С1048. На фиг. 14В показано окрашивание срезов опухоли для выявления CD3 (окрашивание в темноте) в качестве меры степени инфильтрации Т-клеток в опухоли. Инфильтрация Т-клеток в опухоль коррелирует с чувствительностью к протеазе и расщепляемостью субстрата тестируемых вариантов.

[0049] На фиг. 15 и фиг. 16 представлены графики изотермы связывания для активируемых антител к EGFR С225v5 по настоящему изобретению, для активируемых антител к EGFR 3954-2001-С225v5, описанных в данном документе, и для антитела к EGFR С225v5.

[0050] На фиг. 17–19 показаны примерные представленные в данном документе ВАА.

[0051] На фиг. 20 показана фармакокинетика ВАА с двойной маскировкой С1107 после введения однократной дозы 600, 2000 или 4000 мкг/кг.

[0052] На фиг. 21 показана сниженная цитотоксичность С1090 и С1091 по сравнению с С1011 на клетках HT29-luc2.

[0053] На фиг. 22 показана ослабленная активация первичных CD8+ Т-клеток С1090 и С1091 относительно С1011.

[0054] На фиг. 23 показана эффективность на модели вмешательства на опухоли HT29-luc2 у мышей NSG с трансплантированными МКПК. Показывает противоопухолевую активность С1091, С1090 и С1011.

[0055] На фиг. 24 показаны графики уровней IL-6 у яванских макаков *in vivo* через 8 ч после введения дозы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0056] В данном документе представлены антитела, активируемые антитела (АА), биспецифические антитела и биспецифические активируемые антитела (ВАА).

[0057] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены гуманизированные антитела, которые специфически связываются с эpsilon-цепью CD3 (CD3 ϵ ; взаимозаменяемо называемая в данном документе CD3).

[0058] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены антитела IgG1, которые специфически связываются с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), где антитела содержат точечные мутации в области Fc, так что антитело обладает сниженной эффекторной функцией.

[0059] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены АА, например АА, которые специфически связываются с EGFR или CD3. Такие АА оптимизированы в отношении аффинности, эффекторной функции, маскировки и расщепляемости.

[0060] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены ВАА, например ВАА, которые связываются с антигеном-мишенью (например, опухолевым антигеном, таким как мишень, представленная в таблице 9), и вторым антигеном (например, иммунным эффекторным антигеном на иммунной эффекторной клетке). В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой НК-клетку (натуральный киллер). В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой мононуклеарную клетку, такую как миелоидная мононуклеарная клетка. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляют собой ВАА, активирующие иммунные эффекторные клетки. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляют собой ВАА, активирующие лейкоциты. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляют собой биспецифические антитела, активирующие Т-клетки (ТСВ), также упоминаемые в данном документе как ТСВАА. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляют собой активирующие НК-клетки ВАА. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляют собой ВАА, активирующие

макрофагов. В некоторых вариантах осуществления ВАА представляют собой ВАА, привлекающие моноклеарные клетки, такие как ВАА, активирующие миелоидные моноклеарные клетки. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела связывают EGFR и CD3. Такие ВАА оптимизированы в отношении аффинности, эффекторной функции, маскировки и расщепляемости.

[0061] В данном документе также представлены способы получения и способы применения таких антител, АА и ВАА. Данные АА, включая их общее производство и идентификацию маскирующих фрагментов (ММ) и расщепляемых фрагментов (СМ), описаны в международных публикациях № WO 2009/025846 Daugherty et al., опубликовано 26 февраля 2009 г., и в WO 2010/081173 Stagliano et al., опубликовано 15 июля 2010 г., оба из которых включены в качестве ссылки в полном объеме. Данные ВАА, включая их общее производство и идентификацию маскирующих фрагментов (ММ) и расщепляемых фрагментов (СМ), описаны в международных публикациях № WO2015/013671 Lowman et al., опубликовано 29 января 2015 г., и WO2016/014974 Irving et al., опубликовано 28 января 2016 года, оба из которых включены в качестве ссылки в полном объеме. Также в качестве ссылки включены Международная публикация WO2016/014974 Irving et al, опубликовано 28 января 2016 г., и Международная публикация WO2016/118629 Moore et al., опубликовано 28 июля 2016 г., в которой представлены АА, общее производство, ММ и СМ.

[0062] При использовании в данном документе, если не указано иное, термин «антитело» включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает соответствующую мишень, и представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, одноцепочечное, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменное антитело, состоящее из тяжелых цепей и однодоменное антитело, состоящее из легких цепей. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело к представляет собой антитело scFv. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его иммунологически активный фрагмент, который связывает соответствующую мишень, представляет собой мышиное, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

1. Антитела к CD3

[0063] В данном документе представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3 (CD3ε, также называемая в данном документе CD3).

[0064] Типичные аминокислотные последовательности CD3-связывающих антител по раскрытию (вариабельные домены) представлены в таблице 1. (Предсказанные последовательности CDR подчеркнуты). Как указано ниже, L3 представляет собой линкер, связывающий вариабельные домены легкой и тяжелой цепи в типичных CD3-связывающих антителах.

| |
|---|
| Таблица 1 |
| <u>Анти-CD3 вариант v 12</u> |
| Вариабельный домен легкой цепи LV12 QTVVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPG VPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 1) |
| Вариабельный домен тяжелой цепи HV12, где L3 представляет собой SEQ ID NO: 98 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2) |
| LV12-L3-HV12 QTVVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPG VPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGG GGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGN SYVSWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 143) |
| <u>Анти-CD3 вариант v 16</u> |
| Вариабельный домен легкой цепи LV12 Последовательность приведена выше |

| |
|---|
| Вариабельный домен легкой цепи HV20 |
| <u>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 3)</u> |
| LV12-L3-HV20, где L3 представляет собой SEQ ID NO: 98 |
| <u>QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 144)</u> |
| <u>Анти-CD3 вариант v 19</u> |
| Вариабельный домен легкой цепи LV19 |
| <u>QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 4)</u> |
| Вариабельный домен легкой цепи HV20 |
| Последовательность приведена выше |
| LV19-L3-HV20, где L3 представляет собой SEQ ID NO: 98 |
| <u>QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 145)</u> |
| <u>Анти-CD3 вариант v26</u> |
| Вариабельный домен легкой цепи LV19 |
| Последовательность приведена выше |
| Вариабельный домен легкой цепи HV12 |
| Последовательность приведена выше |

| |
|---|
| LV19-L3-HV12, где L3 представляет собой SEQ ID NO: 98 |
| QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLIGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSG GGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 150) |

[0065] Примерные линкеры scFv (обозначенные здесь как «L3», связывающие VH и VL) представлены в таблице 1-1.

Таблица 1-1

| | |
|------------|---|
| SEQ ID NO: | Аминокислотная последовательность линкера |
| 98 | GGGGSGGGGSGGGGS |

[0066] Примерные последовательности CDR связывающих CD3 антител приведены в таблице 2.

Таблица 2

| Название | Последовательности CDR антител к CD3 | SEQ ID NO: |
|----------|--------------------------------------|----------------|
| SP34L1 | RSSTGAVTTSNYAN | SEQ ID NO: 149 |
| SP34L2 | GTNKRAP | SEQ ID NO: 5 |
| SP34L3 | ALWYSNLWV | SEQ ID NO: 6 |
| SP34H1 | TYAMN | SEQ ID NO: 7 |
| SP34H2 | RIRSKYNNYATYYADSVKD | SEQ ID NO: 8 |
| SP34H3 | HGNFGNSYVSWFAY | SEQ ID NO: 9 |

[0067] Как указано в данном документе, антитело к CD3 содержит по меньшей мере одну из последовательностей CDR, представленных в таблице 2.

[0068] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2.

[0069] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3.

[0070] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0071] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0072] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0073] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0074] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0075] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0076] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.

[0077] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.

[0078] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой антитело scFv. В некоторых вариантах осуществления переменные домены содержат следующую структуру от N конца к C концу: LV-HV. В некоторых вариантах осуществления переменные домены содержат следующую структуру от N конца к C концу: HV-LV.

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой антитело scFv, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), связанную с переменной областью легкой цепи (VL), где VH связана с VL посредством линкера,

содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. Примерные последовательности с таким линкером представлены в таблице 1.

[0080] В примерных вариантах осуществления в настоящем документе представлено антитело, которое специфически связывается с CD3 (AB), где антитело представляет собой антител IgG1 или scFv, связанное с областью Fc, где антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что антитело имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой любой один или несколько из L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в положении N297. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит мутацию N297Q. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены L234F, L235E, P331S и N297Q. В некоторых вариантах осуществления переменный домен тяжелой цепи антитела содержит любую из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или в котором переменный домен легкой цепи AB содержит любой из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.

2. Активируемые антитела к CD3

[0081] В некоторых вариантах осуществления любое из антител CD3, представленных в данном документе, имеет формат активируемого антитела (AA).

[0082] Как в общем случае предусмотрено в данном документе, AA по настоящему изобретению содержат конструкции MM-CM, также называемые в данном документе продоменом. Соответственно, используемый в данном документе термин «продомен» относится к полипептиду, содержащему маскирующий фрагмент (MM) и расщепляемый фрагмент (CM). В некоторых вариантах осуществления MM и CM разделены линкером, обозначаемым здесь как L1. В некоторых вариантах осуществления продомен состоит из линкера на карбоксильном конце CM; этот линкер, обозначаемый в данном документе как L2, связывает CM продомена AB. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит линкер между MM и CM и линкер после CM. В некоторых вариантах осуществления MM и CM не разделены линкером. В некоторых вариантах осуществления

продомен содержит одну из следующих формул (где приведенная ниже формула представляет аминокислотную последовательность в направлении от N-конца к C-концу или в направлении от C-конца к N-концу): (MM)-L1-(CM), (MM)-(CM)-L2, (MM)-L1-(CM)-L2 или (MM)-(CM). В примерных вариантах осуществления продомен содержит MM и CM EGFR, расщепляемые матриптазой или MMP; или MM и CM CD3ε, расщепляемые матриптазой или MMP. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит MM и CM EGFR, расщепляемые матриптазой и MMP. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит MM и CM CD3ε, расщепляемые матриптазой и MMP. В данном документе представлены активируемые антитела (AA), содержащие продомен. Также в данном документе представлены нуклеотиды, кодирующие продомен домена по изобретению.

[0083] Соответственно, в данном документе представлен CD3 AA, содержащий: (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3 (CD3ε), где антитело содержит домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или содержит домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; (b) маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, причем MM уменьшает или ингибирует связывание AB с CD3ε, когда AA находится в нерасщепленном состоянии; и (c) расщепляемый фрагмент (CM), связанный с AB, при этом CM представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. Как описано выше, (b) и (c) вместе являются частью продомена.

[0084] В некоторых вариантах осуществления AB AA к CD3 представляет собой любое из антител к CD3, описанных в предыдущем разделе.

[0085] В некоторых вариантах осуществления AB AA к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2.

[0086] В некоторых вариантах осуществления AB AA к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3.

[0087] В некоторых вариантах осуществления AB AA к CD3 содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0088] В некоторых вариантах осуществления AB AA к CD3 содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0089] В некоторых вариантах осуществления AB AA к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 и домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0090] В некоторых вариантах осуществления АВ АА к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3 и домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0091] В некоторых вариантах осуществления АВ АА к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3 и домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0092] В некоторых вариантах осуществления АВ представляет собой антитело scFv, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH), связанную с переменной областью легкой цепи (VL), где VH связана с VL посредством линкера L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98. Примерные последовательности с таким линкером представлены в таблице 1.

[0093] В некоторых вариантах осуществления ММ АА к CD3 содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 3.

[0094] Типичные маскирующие фрагменты (ММ) для CD3 по изобретению представлены в таблице 3.

[0095] В некоторых вариантах осуществления ММ АА к CD3 содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления ММ АА к CD3 представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления ММ АА к CD3 представляет собой последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11.

Таблица 3

| мм | Название | Последовательность АА | SEQ ID NO: |
|--------|----------|-----------------------|---------------|
| CD3 ММ | JF15865 | ММУСГГНЕВЛСГПРВ | SEQ ID NO: 10 |
| CD3 ММ | JF15003 | ГУРВГСЭУНССГГТТ | SEQ ID NO: 11 |
| CD3 ММ | h20GG | ГУЛВГСЭУНССГГТТ | SEQ ID NO: 12 |

[0096] В некоторых вариантах осуществления СМ АА к CD3 содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 4. Примерные расщепляемые фрагменты (СМ) по изобретению представлены в таблице 4.

[0097] В некоторых вариантах осуществления СМ АА данного раскрытия содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 4-1.

Таблица 4

| Название СМ | Последовательность АА | SEQ ID NO: |
|----------------|-----------------------|---------------|
| 0001 | LSGRSDNH | SEQ ID NO: 13 |
| 0011 | LSGRSDDH | SEQ ID NO: 14 |
| 2001 | ISSGLLSGRSDNH | SEQ ID NO: 15 |
| 2008 | ISSGLLSGRSDQH | SEQ ID NO: 16 |
| 2006 | ISSGLLSGRSDDH | SEQ ID NO: 17 |

Таблица 4-1

| Название СМ | Последовательность АА | SEQ ID NO: |
|-------------|-----------------------|---------------|
| 0001 | LSGRSDNH | SEQ ID NO: 18 |
| 0002 | LSGRSGNH | SEQ ID NO: 19 |
| 0003 | TSTSGRSANPRG | SEQ ID NO: 20 |
| 1001 | ISSGLLSS | SEQ ID NO: 21 |
| 1002 | QNQALRMA | SEQ ID NO: 22 |
| 1003 | VHMPLGFLGP | SEQ ID NO: 23 |
| 1004 | AVGLLAPP | SEQ ID NO: 24 |
| 0011 | LSGRSDDH | SEQ ID NO: 25 |
| 0021 | LSGRSDIH | SEQ ID NO: 26 |
| 0031 | LSGRSDQH | SEQ ID NO: 27 |
| 0041 | LSGRSDTH | SEQ ID NO: 28 |
| 0051 | LSGRSDYH | SEQ ID NO: 29 |
| 0061 | LSGRSDNP | SEQ ID NO: 30 |
| 0071 | LSGRSANP | SEQ ID NO: 31 |
| 0081 | LSGRSANI | SEQ ID NO: 32 |
| 0091 | LSGRSDNI | SEQ ID NO: 33 |
| 2001 | ISSGLLSGRSDNH | SEQ ID NO: 34 |
| 2002 | ISSGLLSGRSGNH | SEQ ID NO: 35 |
| 2003 | ISSGLLSGRSANPRG | SEQ ID NO: 36 |
| 2005 | AVGLLAPPSGRSANPRG | SEQ ID NO: 37 |
| 2006 | ISSGLLSGRSDDH | SEQ ID NO: 38 |
| 2007 | ISSGLLSGRSDIH | SEQ ID NO: 39 |

| Название СМ | Последовательность АА | SEQ ID NO: |
|-------------|-----------------------|---------------|
| 2008 | ISSGLLSGRSDQH | SEQ ID NO: 40 |
| 2009 | ISSGLLSGRSDTH | SEQ ID NO: 41 |
| 2010 | ISSGLLSGRSDYH | SEQ ID NO: 42 |
| 2011 | ISSGLLSGRSDNP | SEQ ID NO: 43 |
| 2012 | ISSGLLSGRSANP | SEQ ID NO: 44 |
| 2013 | ISSGLLSGRSANI | SEQ ID NO: 45 |
| 2014 | ISSGLLSGRSDNI | SEQ ID NO: 46 |
| 3001 | AVGLLAPPGGLSGRSDNH | SEQ ID NO: 47 |
| 3006 | AVGLLAPPGGLSGRSDDH | SEQ ID NO: 48 |
| 3007 | AVGLLAPPGGLSGRSDIH | SEQ ID NO: 49 |
| 3008 | AVGLLAPPGGLSGRSDQH | SEQ ID NO: 50 |
| 3009 | AVGLLAPPGGLSGRSDTH | SEQ ID NO: 51 |
| 3010 | AVGLLAPPGGLSGRSDYH | SEQ ID NO: 52 |
| 3011 | AVGLLAPPGGLSGRSDNP | SEQ ID NO: 53 |
| 3012 | AVGLLAPPGGLSGRSANP | SEQ ID NO: 54 |
| 3013 | AVGLLAPPGGLSGRSANI | SEQ ID NO: 55 |
| 3014 | AVGLLAPPGGLSGRSDNI | SEQ ID NO: 56 |

3. Антитела с мутациями Fc

[0098] В данном документе представлены антитела IgG1, имеющие мутации Fc, или фрагменты антител, содержащие антигенсвязывающие домены (например, scFv, Fab, F(ab')₂), связанные с доменом Fc, где Fc проявляет пониженную эффекторную функцию (называемые в данном документе вариантами Fc). Любое из описанных в данном документе ВАА, АА и антител может содержать любые раскрытые в данном документе варианты Fc.

[0100] Антитела, содержащие такие мутации Fc, приводят к снижению эффекторной функции при сохранении аффинности связывания с мишенью. Соответственно, в данном документе представлены антитела, которые связываются с интересующей мишенью, где антитело представляет собой антитело IgG1 или фрагмент антитела, связанный с Fc, где область Fc содержит аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что антитело имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена представляет

собой любой один или несколько из L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления имеется дополнительная мутация в N297. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой N297Q или N297A.

[0101] В некоторых вариантах осуществления Fc выбран из последовательностей Fc, представленных в таблице 4-2. В некоторых вариантах осуществления Fc выбран из SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO: SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 160, где X выбран из группы, состоящей из любой встречающейся в природе аминокислоты (например, аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, пирролизина, селеноцистеина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина) или каждой из не встречающихся в природе аминокислот (например, транс-3-метилпролина, 2,4-метанопролина, цис-4-гидроксипролина, транс-4-гидроксипролина, N-метилглицина, аллотреонина, метилтреонина, гидроксиэтилцистеина, гидроксиэтилгомоцистеина, нитроглутамина, гомоглутамина, пипеколиновой кислоты, трет-лейцина, норвалина, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина и 4-фторфенилаланина).

Таблица 4-2

| Название | Последовательность AA |
|---------------------------------|--|
| SEQ ID NO: | |
| Fc-N297X (SEQ ID NO: 154) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSD HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYXSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-N297Q (SEQ ID NO: 155) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSD HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV |

| | |
|----------------------------------|---|
| Название | Последовательность АА |
| SEQ ID NO: | |
| | SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-L234X (SEQ ID NO: 156) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEXLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-L234F (SEQ ID NO: 157) | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTFPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-L235X (SEQ ID NO: 158) | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTFPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELXGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| Название | Последовательность АА |
|-------------------------------------|---|
| SEQ ID NO: | |
| Fc-L235E (SEQ ID NO: 159) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-P331X (SEQ ID NO: 160) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAXIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-P331S (SEQ ID NO: 161) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| Fc-Fcmt3 (SEQ ID NO: 162) | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| | |
|--|--|
| Название | Последовательность АА |
| SEQ ID NO: | |
| C225v5Fcmt 4 HC (SEQ ID NO: 163 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0102] В данном документе представлены антитела, АА, биспецифические антитела и ВАА, содержащие такие мутации Fc.

[0103] В некоторых вариантах осуществления такие АА и ВАА, содержащие вариант Fc, могут связывать иммунную эффекторную клетку. В некоторых вариантах осуществления они могут связывать мишень, избирательно расположенную на иммунной эффекторной клетке. В некоторых вариантах они могут связывать CD3. В некоторых вариантах они могут связывать любую мишень, указанную в таблице 9. В некоторых вариантах они могут связывать EGFR.

[0104] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено активируемое антитело (АА), содержащее:

- a) антитело (АВ), которое специфически связывается с мишенью, где антитело представляет собой антитело IgG1, и где область Fc антитела содержит аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет пониженную эффекторную функцию;
- b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с мишенью, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и
- c) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, причем СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

[0105] В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235, N297 и P331

(нумерация в соответствии с индексом ЕУ согласно Кабату) таким образом, что АА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления мишень выбрана из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0106] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено биспецифическое активируемое антитело (ВАА), содержащее:

- а) антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем АВ1 содержит:
 - i. две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и
 - ii. первый маскирующий фрагмент (ММ1), связанный с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, при этом карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, причем
 - ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и
 - СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,
- б) два scFv (АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждое АВ2 содержит:
 - i. переменную область тяжелой цепи, связанную с переменной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и
 - ii. второй маскирующий фрагмент (ММ2), связанный со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2) с образованием конструкции ММ2-СМ2, причем карбоксильный конец конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, при этом
 - ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и
 - СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

[0107] и причем АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом ЕУ согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0108] В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем документе, ВАА, представленные в настоящем документе, содержат:

- а) биспецифическое активируемое антитело (ВАА), содержащее:

i) антитело IgG (AB1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем AB1 содержит две тяжелые цепи (AB1 HC) и две легкие цепи (AB1 LC); и при этом AB1 связан с первым маскирующим фрагментом (MM1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (CM1) с образованием конструкции MM1-CM1, причем карбоксильный конец конструкции MM1-CM1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи AB1, при этом

MM1 ингибирует связывание AB1 с его мишенью; и

CM1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,

ii) два scFv (каждый AB2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждый AB2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, связанную с вариабельной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого AB2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей AB1; и причем каждый AB2 связан со вторым маскирующим фрагментом (MM2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (CM2), с образованием конструкции MM2-CM2, при этом карбоксильный конец каждой конструкции MM2-CM2 связан с аминоконцом каждого AB2, причем

MM2 ингибирует связывание AB2 с его мишенью; и

CM2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

[0109] и причем AB1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и R331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

4. Антитела к EGFR

[0110] В настоящем документе представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (AB), которые специфически связываются с EGFR. Примерные последовательности CDR связывающих EGFR антител приведены в таблице 5.

[0111] В настоящем документе представлены антитела к EGFR, биспецифические антитела с одной ножкой, нацеленной на EGFR, AA, способные связывать EGFR при активации, и ВАА, способные связывать EGFR при активации. В некоторых вариантах осуществления антитело к EGFR включает CDR из таблицы 5.

[0112] В некоторых вариантах осуществления, например, в формате ВАА, в данном документе представлены антитела IgG1, которые специфически связываются с

рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) обеспечивают сниженную эффекторную функцию. Антитела содержат мутации Fc, которые приводят к снижению эффекторной функции при сохранении аффинности связывания EGFR. Соответственно, в данном документе представлены антитела, которые связываются с EGFR, где антитело представляет собой антитело IgG1, где антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что антитело имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой любой один или несколько из L234F, L235E и P331S.

[0113] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331.

[0114] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331.

[0115] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S.

[0116] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в N297 вместе с аминокислотной заменой по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и/или P331. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит мутацию N297Q. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит мутацию N297A.

[0117] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит замены L234F, L235E, P331S и N297Q. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит замены L234F, L235E, P331S и N297A.

[0118] Типичные последовательности CDR EGFR-связывающих антител представлены в таблице 5, приведенной у Kabat.

Таблица 5

| Название | Последовательность | SEQ ID NO: |
|----------|--------------------|---------------|
| C225L1 | RASQSIGTNIH | SEQ ID NO: 57 |
| C225L2 | YASESIS | SEQ ID NO: 58 |
| C225L3 | QQNNNWPTT | SEQ ID NO: 59 |
| C225H1 | NYGVH | SEQ ID NO: 60 |
| C225H2 | VIWSGGNTDYNTPTFS | SEQ ID NO: 61 |

| | | |
|--------|------------|---------------|
| C225H3 | ALTYDYEFAY | SEQ ID NO: 62 |
|--------|------------|---------------|

[0119] Примерные аминокислотные последовательности связывающих EGFR антител приведены в таблице 6. (VL и VH обозначают переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи соответственно; LC и HC обозначают легкую и тяжелую цепи соответственно).

[0120] В некоторых вариантах осуществления антитела к EGFR содержат любую одну из последовательностей, представленных в таблице 6.

[0121] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела EGFR содержит любую одну из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, приведенные в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела к EGFR содержит любую из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 73, где X выбран из группы, состоящей из любой встречающейся в природе аминокислоты (например, аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, пирролизина, селеноцистеина, серина, треонина, триптофана, тирозина, валина) или каждой из не встречающихся в природе аминокислот (например, транс-3-метилпролина, 2,4-метанопролина, цис-4-гидроксипролина, транс-4-гидроксипролина, N-метилглицина, аллотреонина, метилтреонина, гидроксиэтилцистеина, гидроксиэтилгомоцистеина, нитроглутамина, гомоглутамина, пипеколиновой кислоты, трет-лейцина, норвалина, 2-азафенилаланина, 3-азафенилаланина, 4-азафенилаланина и 4-фторфенилаланина). Обозначение Fcmt3 содержит тройную точечную мутацию, где область Fc тяжелой цепи антитела EGFR включает следующие три точечные мутации: L234F, L235E и P331S. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антитело к EGFR содержит тяжелую цепь с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: C225v5Fcmt3 HC. В некоторых вариантах осуществления область Fc тяжелой цепи антитела EGFR содержит четвертую точечную мутацию, N297Q. Обозначение Fcmt4 содержит трехточечную мутацию Fcmt3 и четвертую точечную мутацию N297Q. Соответственно, в таких вариантах осуществления антитело к EGFR содержит тяжелую цепь с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 76.

Таблица 6

| Название | Последовательность АА |
|--|---|
| SEQ ID NO: | |
| C225v5-VL (SEQ ID NO: 63) | QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTK LELK |
| C225v5-VH (SEQ ID NO: 64) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A) |
| C225v5 LC (SEQ ID NO: 65) | QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTK LELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC |
| C225v5 HC (SEQ ID NO: 66) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK |
| C225v5N297 X HC (SEQ ID NO: 67) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP |

| | |
|--|---|
| Название | Последовательность АА |
| SEQ ID NO: | |
| | REEQYXSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK |
| C225v5N297 Q HC (SEQ ID NO: 68) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK |
| C225v5 L234X HC (SEQ ID NO: 69) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEXLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK |
| C225v5 L234F HC (SEQ ID NO: 70) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPSVFLF |

| | |
|--|---|
| Название | Последовательность АА |
| SEQ ID NO: | |
| | PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| C225v5 L235X HC (SEQ ID NO: 71) | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELXGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK |
| C225v5 L235E HC (SEQ ID NO: 72) | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| C225v5 P331X HC (SEQ ID NO: | QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL |

| | |
|--|--|
| Название | Последовательность АА |
| SEQ ID NO: | |
| 73) | GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAXIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSPGK |
| C225v5 P331S HC (SEQ ID NO: 74) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSPGK |
| C225v5Fcmt 3 HC (SEQ ID NO: 75) | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSPGK |
| C225v5Fcmt 4 HC | QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG VIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG |

| | |
|--------------------------------------|--|
| Название | Последовательность AA |
| SEQ ID NO: | |
| (SEQ ID NO: 76) | CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| SynFcmt4 HC (SEQ ID NO: 77) | QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQPPGKALEWL ADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYC ARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVS(S/A)ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK |

5. Активируемые антитела к EGFR

[0122] В некоторых вариантах осуществления любое из антител EGFR, представленных в данном документе, имеет формат AA (EGFR AA). Как описано выше для AA к CD3, AA к EGFR также содержат продомен.

[0123] Соответственно, в настоящем документе представлены AA, содержащие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (AB), которые специфически связываются с EGFR. Примерные последовательности CDR связывающих EGFR антител приведены в таблице 5.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, AA содержит: (a) любое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR); (b) и продомен, где продомен содержит (i) маскирующий фрагмент (MM), связанный с AB, где MM уменьшает или ингибирует

связывание АВ с EGFR, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, и где ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7; и (ii) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

[0125] Типичные маскирующие фрагменты (ММ) EGFR по изобретению представлены в таблице 7 и таблице 8.

Таблица 7

| мм | Название | Последовательность АА | SEQ ID NO: |
|---------|----------|-----------------------|---------------|
| EGFR ММ | CF41 | LSCEGWAMNREQCRA | SEQ ID NO: 78 |
| EGFR ММ | CF08 | PPLECNTKSMCSKHD | SEQ ID NO: 79 |
| EGFR ММ | CF13 | DRDCRGRRARCCQEG | SEQ ID NO: 80 |
| EGFR ММ | CF19 | FTCEGWAMNREQCRT | SEQ ID NO: 81 |
| EGFR ММ | CF22 | GRCPPSRDIRFCTYM | SEQ ID NO: 82 |
| EGFR ММ | CF46 | FSCEGWAMNRSQCRT | SEQ ID NO: 83 |
| EGFR ММ | CF48 | FTCEGWAMNRDQCRT | SEQ ID NO: 84 |

Таблица 8

| мм | Название | Последовательность АА | SEQ ID NO: |
|---------|----------|-----------------------|---------------|
| EGFR ММ | 3954 | CISPRGCPDGPYVMY | SEQ ID NO: 85 |
| EGFR ММ | 3954a | CISPRGCPDGPYVM | SEQ ID NO: 86 |
| EGFR ММ | 3960 | CISPRGC | SEQ ID NO: 87 |

[0126] В некоторых вариантах осуществления ММ АА к EGFR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления ММ АА к EGFR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

[0127] В некоторых вариантах осуществления СМ АА к EGFR содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 4; В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В

некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0128] В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено активируемое антитело (АА), содержащее: (а) антитело, которое специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и где область Fc антитела содержит аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет сниженную эффекторную функцию; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, где ММ снижает или ингибирует связывание АВ с EGFR, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. Антитела IgG1 к EGFR могут представлять собой любые антитела IgG1, описанные в непосредственно предшествующем разделе. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7.

[0129] В примерном варианте осуществления в настоящем документе представлено активируемое антитело (АА), содержащее: (а) антитело (АВ), которое специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), причем АВ представляет собой антитело IgG1 и при этом область Fc АВ содержит аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет сниженную эффекторную функцию; (b) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ снижает или ингибирует связывание АВ с EGFR, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и (с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, при этом СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная замена представляет собой любой один или несколько из L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в положении N297. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит мутацию N297Q. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит аминокислотные замены L234F, L235E, P331S и N297Q. В некоторых вариантах

осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в 7 или таблице 8. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 4; В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления АА представляет собой часть ВАА.

6. Биспецифические активируемые антитела (ВАА)

[0130] В данном документе представлены ВАА (биспецифические АА, ВАА), где указанные ВАА при активации специфически связываются с двумя мишенями (например, связывают две разные мишени или связывают два разных эпитопа на одной и той же мишени) и могут содержать один из примеров структуры, представленные на фиг. 17-19.

[0131] В некоторых вариантах осуществления первая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9, а вторая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0132] Как обычно предусмотрено в данном документе и как описано выше в разделе, описывающем АА, ВАА по изобретению содержат конструкции ММ-СМ, также называемые в данном документе продоменом. Соответственно, используемый в данном документе термин «продомен» относится к полипептиду, содержащему маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ). В некоторых вариантах осуществления ММ и СМ разделены линкером, обозначаемым здесь как L1. В некоторых вариантах осуществления продомен состоит из линкера на карбоксильном конце СМ; этот линкер, обозначаемый в данном документе как L2, связывает СМ продомена АВ. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит линкер между ММ и СМ и линкер после СМ. В некоторых вариантах осуществления ММ и СМ не разделены линкером. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит одну из следующих формул (где приведенная ниже формула представляет аминокислотную последовательность в направлении от N-конца к C-концу или в направлении от C-конца к N-концу): (ММ)-L1-(СМ), (ММ)-(СМ)-L2, (ММ)-L1-(СМ)-L2 или (ММ)-(СМ). В примерных вариантах осуществления продомен содержит ММ и СМ EGFR, расщепляемые матриптазой или

ММР; или ММ и СМ CD3ε, расщепляемые матриптазой или ММР. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит ММ и СМ EGFR, расщепляемые матриптазой и ММР. В некоторых вариантах осуществления продомен содержит ММ и СМ CD3ε, расщепляемые матриптазой и ММР. В данном документе представлены биспецифические активируемые антитела (ВАА), содержащие продомен. Также в данном документе представлены нуклеотиды, кодирующие продомен домена по изобретению.

[0133] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены ВАА, где указанные ВАА, будучи активированными, специфически связываются с двумя мишенями (например, двумя разными мишенями или двумя разными эпитопами на одной и той же мишени), и где указанные ВАА, будучи не активированными, содержат следующие структуры:

- a) антитело IgG (AB1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем AB1 содержит:
 - i. две тяжелые цепи (AB1 HC) и две легкие цепи (AB1 LC); и
 - ii. первый маскирующий фрагмент (MM1), связанный с первым расщепляемым фрагментом (SM1) с образованием конструкции MM1-SM1, при этом карбоксильный конец конструкции MM1-SM1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи AB1, причем
 1. MM1 ингибирует связывание AB1 с его мишенью; и
 2. SM1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,
 - b) два scFv (AB2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, где каждый AB2 содержит:
 - i. переменную область тяжелой цепи, связанную с переменной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого AB2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей AB1; и
 - ii. второй маскирующий фрагмент (MM2), связанный со вторым расщепляемым фрагментом (SM2) с образованием конструкции MM2-SM2, причем карбоксильный конец конструкции MM2-SM2 связан с аминоконцом каждого AB2, при этом
 - MM2 ингибирует связывание AB2 с его мишенью; и
 - SM2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,
- и причем ВАА имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:
- i. MM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

- ii. ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7;
- iii. АВ2 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; и
- iv. АВ1 содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 или L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом ЕU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0134] В некоторых вариантах осуществления ВАА, представленные в настоящем документе, содержат:

1. Биспецифическое активируемое антитело (ВАА), причем указанное ВАА при активации специфически связывается с двумя мишенями и имеет следующую структуру:

- a. антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем АВ1 содержит две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и при этом АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, причем карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, при этом ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,
- b. два scFv (каждый АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждый АВ2 содержит вариабельную область легкой цепи, связанную с вариабельной областью тяжелой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и причем каждый АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2), с образованием конструкции ММ2-СМ2, при этом карбоксильный конец каждой конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, причем ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и

СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

и причем ВАА имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:

- i. ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;
- ii. ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7;
- iii. АВ2 содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; и
- iv. АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0135] В некоторых вариантах осуществления ВАА, представленные в настоящем документе, содержат:

- a) антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем АВ1 содержит:
 - a. две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и
 - b. первый маскирующий фрагмент (ММ1), связанный с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, при этом карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, причем
 1. ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и
 2. СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,
- b) два scFv (АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждое АВ2 содержит:
 - a. переменную область тяжелой цепи, связанную с переменной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и
 - b. второй маскирующий фрагмент (ММ2), связанный со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2) с образованием конструкции ММ2-СМ2, причем карбоксильный конец конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, при этом

1. ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и
2. СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы, и причем АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0136] В некоторых вариантах осуществления ВАА, представленные в настоящем документе, содержат:

- (1) биспецифическое активируемое антитело (ВАА), содержащее:
 - (a) антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, причем АВ1 содержит две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и при этом АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, причем карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, при этом
 - ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и
 - СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,
 - (b) два scFv (каждый АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, причем каждый АВ2 содержит переменную область тяжелой цепи, связанную с переменной областью легкой цепи, при этом карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и причем каждый АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2), с образованием конструкции ММ2-СМ2, при этом карбоксильный конец каждой конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, причем
 - ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и

СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

и причем АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0137] Как указано выше, ВАА по изобретению содержат два scFv (АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью. VL и VH scFv могут быть расположены в любом порядке, VL-VH или VH-VL.

[0138] В некоторых вариантах осуществления Fc-область АВ1 содержит аминокислотные замены по меньшей мере в аминокислотных положениях L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления первая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9, а вторая мишень выбирается из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0139] В некоторых вариантах осуществления АВ1 связывает целевой антиген, например опухолевый антиген, и АВ2 связывает мишень иммунного эффектора.

[0140] В некоторых вариантах осуществления АВ2 связывает целевой антиген, например опухолевый антиген, и АВ1 связывает мишень иммунного эффектора.

[0141] В некоторых вариантах осуществления АВ1 связывает EGFR и АВ2 связывает CD3.

[0142] В некоторых вариантах осуществления ММ1 содержит SEQ ID NO: 78.

[0143] В некоторых вариантах осуществления ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

[0144] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое АА представляет собой С1106, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0145] В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой С1107, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0146] В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой С1101, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0147] В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой С1102, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0148] В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой С1104, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0149] В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой CI079, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0150] В некоторых вариантах осуществления ВАА представляет собой CI090, как представлено в таблице 11 в примере 1.

[0151] В примерном варианте осуществления АВ1 содержит аминокислотную последовательность C225v5Fcmt3 HC или C225v5Fcmt4 HC.

[0152] В некоторых вариантах осуществления первая и вторая протеазы представляют собой одну и ту же протеазу. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая протеазы представляют собой разные протеазы. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 содержат одинаковую аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 содержат разные аминокислотные последовательности. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 содержат разные аминокислотные последовательности, которые расщепляются одной и той же протеазой или протеазами. В некоторых вариантах осуществления CM1 и CM2 расщепляются более чем одной протеазой. В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 расщепляются сериновой протеазой. В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 расщепляются матриксной металлопротеиназой (ММР). В некоторых вариантах осуществления CM1 и/или CM2 расщепляются сериновой протеазой и ММР.

[0153] Примерные ВАА по раскрытию включают, например, показанные в примерах, представленных в данном документе, и их варианты.

[0154] В некоторых неограничивающих вариантах осуществления по меньшей мере один из АВ в ВАА является специфичным для CD3, и по меньшей мере один другой АВ является партнером по связыванию для любой мишени, указанной в таблице 9.

[0155] В примерном варианте осуществления АВ2 ВАА является специфичным для CD3, а АВ1 является партнером по связыванию для любой мишени, указанной в таблице 9.

Таблица 9. Примерные мишени

| | | | | | |
|---------------------|------|------|-------------------|-------------|--------|
| 1-92-LFA-3 | CD52 | DL44 | HVEM | LAG-3 | STEAP1 |
| Альфа-4 интегрин | CD56 | DLK1 | Гиалуронида за | LIF-R | STEAP2 |
| Альфа-V интегрин | CD64 | DLL4 | ICOS | Антиген LeX | TAG-72 |

| | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Альфа-4- бета-1 интегрин | CD70 | DPP-4 | IFN-альфа | LIGHT | TAPA1 |
| Альфа-4- бета-7 интегрин | CD71 | DSG1 | IFN-бета | LRP4 | TGF-бета |
| AGR2 | CD74 | EGFR | IFN-гамма | LRRC26 | TIGIT |
| Антиген LeY | | EGFRviii | IgE | MCSP | TIM-3 |
| Рецептор ApJ | CD80 | Рецептор эндотелина В (ETBR) | Рецептор IgE (FcεRI) | Мезотелин | TLR2 |
| APRIL | CD81 | ENPP3 | IGF | MRP4 | TLR4 |
| B7-H4 | CD86 | EpCAM | IGF1R | MUC1 | TLR6 |
| BAFF | CD95 | EPHA2 | IL1B | Муцин-16 (MUC16, CA-125) | TLR7 |
| ВТLА | CD117 | EPHB2 | IL1R | Na/K АТФаза | TLR8 |
| Комплемент C5 | CD125 | ERBB3 | IL2 | Нейтрофильн ая эластаза | TLR9 |
| C-242 | CD132 (IL-2RG) | Белок F RSV | IL11 | NGF | TMEM31 |
| CA9 | CD133 | FAP | IL12 | Никастрин | TNF-альфа |
| CA19-9 (Антиген Lea) | CD137 | FGF-2 | IL12p40 | Рецепторы Notch | TNFR |
| Карбоновая ангидраза 9 | CD138 | FGF8 | IL-12R, IL-12R-бета- 1 | Notch 1 | TNFRS12 A |
| CD2 | CD166 | FGFR1 | IL13 | Notch 2 | TRAIL-R1 |
| CD3 | CD172A | FGFR2 | IL13R | Notch 3 | TRAIL-R2 |
| CD6 | CD248 | FGFR3 | IL15 | Notch 4 | Трансферр ин |

| | | | | | |
|--------|---------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|
| CD9 | CDH6 | FGFR4 | IL17 | NOV | Рецептор трансферр ина |
| CD11a | CEACAM5 (CEA) | Рецептор фолата | IL18 | OSM-R | TRK-A |
| CD19 | CEACAM6 (NCA-90) | GAL3ST1 | IL21 | OX-40 | TRK-B |
| CD20 | CLAUDIN-3 | G-CSF | IL23 | PAR2 | uPAR |
| CD22 | CLAUDIN-4 | G-CSFR | IL23R | PDGF-AA | VAP1 |
| CD24 | cMet | GD2 | IL27/IL27R (wsx1) | PDGF-BB | VCAM-1 |
| CD25 | Коллаген | GITR | IL29 | PDGFR- альфа | VEGF |
| CD27 | Cripto | GLUT1 | IL-31R | PDGFR-бета | VEGF-A |
| CD28 | CSFR | GLUT4 | IL31/IL31R | PD-1 | VEGF-B |
| CD30 | CSFR-1 | GM-CSF | IL2R | PD-L1 | VEGF-C |
| CD33 | CTLA-4 | GM-CSFR | IL4 | PD-L2 | VEGF-D |
| CD38 | CTGF | GP IIb/рецептор ы IIIa | IL4R | Фосфатидил- серин | VEGFR1 |
| CD40 | CXCL10 | Gp130 | IL6, IL6R | P1GF | VEGFR2 |
| CD40L | CXCL13 | GPIIb/IIIa | Рецептор инсулина | PSCA | VEGFR3 |
| CD41 | CXCR1 | GPNMB | Лиганды JAG | PSMA | VISTA |
| CD44 | CXCR2 | GRP78 | JAG1 | RAAG12 | WISP-1 |
| CD44v6 | | HER2/neu | JAG2 | RAGE | WISP-2 |
| CD47 | CXCR4 | HGF | | SLC44A4 | WISP-3 |
| CD51 | CYR61 | hGH | | Сфингозин 1 фосфат | |

[0156] В некоторых вариантах осуществления немаскированное биспецифическое антитело к EGFR-CD3 демонстрирует EGFR-зависимое уничтожение опухолевых клеток, в то время как ВАА к EGFR-CD3 с двойной маскировкой снижает целевую цитотоксичность более чем в 100 000 раз. В известных моделях опухолей, где ожидается

активность резидентных протеаз, показано, что ВАА потенциально индуцируют регрессию опухоли. У приматов, не являющихся людьми, максимальная переносимая доза (MTD) ВАА к EGFR-CD3 более чем в 60 раз превышает MTD немаскированного биспецифического антитела, а переносимое воздействие (AUC) более чем в 10 000 раз выше. Несмотря на 60-кратную разницу в дозах при MTD, кратковременное повышение сывороточного цитокина и АСТ/АЛТ, наблюдаемое у приматов, не являющихся людьми, получавших ВАА, все еще ниже, чем индуцированные биспецифическими антителами. Локализуя активность в микроокружении опухоли, ВАА могут расширить клинические возможности биспецифической терапии с участием Т-клеток, которая ограничена токсичностью в отношении мишени, особенно при солидных опухолях. Более того, ВАА к EGFR-CD3 обладает потенциалом для лечения EGFR-экспрессирующих опухолей, которые плохо реагируют на существующие EGFR-направленные терапии.

7. Расщепляемые фрагменты (СМ)

[0157] Как моноспецифичные АА, так и ВАА по настоящему изобретению в замаскированном и неактивированном состоянии содержат по меньшей мере один СМ.

[0158] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент (СМ) АА или ВАА включает аминокислотную последовательность, которая может служить в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы, обычно внеклеточной протеазы. В случае ВАА, СМ может быть выбран на основе протеазы, которая расположена в той же ткани, что и желаемая мишень по меньшей мере одного АВ из ВАА или АА. СМ может служить в качестве субстрата для множества протеаз, например, субстрата для сериновой протеазы и второй отличной протеазы, например, ММР. В некоторых вариантах осуществления СМ может служить в качестве субстрата для более чем одной сериновой протеазы, например, матриптазы и uPA. В некоторых вариантах осуществления СМ может служить субстратом для более чем одной ММР, например, ММР9 и ММР14.

[0159] Известно множество различных условий, в которых интересующая мишень локализуется совместно с протеазой, где субстрат протеазы известен в данной области. В примере рака тканью-мишенью может быть раковая ткань, в частности, раковая ткань солидной опухоли. В литературе имеются сообщения о повышенных уровнях протеаз при ряде раковых заболеваний, например, при опухолях жидкой ткани или солидных опухолях. См., например, La Rocca et al. (2004) *British J. of Cancer* 90 (7): 1414–1421. Неограничивающие примеры заболевания включают: все типы раковых заболеваний (таких как, но не ограничиваясь ими, рак молочной железы, легких, колоректальный рак, рак желудка, глиобластома, рак яичников, рак эндометрия, рак почек, саркома, рак кожи,

рак шейки матки, рак печени, рак мочевого пузыря, холангиокарцинома, рак предстательной железы, меланома, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак поджелудочной железы и т. д.), ревматоидный артрит, болезнь Крона, СКВ, сердечно-сосудистые повреждения, ишемия и т. д. Например, показания могут включать лейкозы, включая Т-клетки острый лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ), лимфобластные заболевания, включая множественную миелому, и солидные опухоли, включая рак легкого, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы и молочной железу, включая тройной негативный рак молочной железы. Например, показания включают заболевание костей или метастазирование при раке, независимо от первичного происхождения опухоли; рак молочной железы, в том числе в качестве неограничивающего примера, ER/PR+ рак молочной железы, Her2+ рак молочной железы, тройной негативный рак молочной железы; колоректальный рак; рак эндометрия; рак желудка; глиобластому; рак головы и шеи, такой как плоскоклеточный рак головы и шеи; рак пищевода; рак легких, такой как, в качестве неограничивающего примера, немелкоклеточный рак легких; множественная миелома, рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; саркому, такую как остеосаркома; рак почки, такой как, в качестве неограничивающего примера, почечноклеточный рак; и/или рак кожи, такой как, в качестве неограничивающего примера, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак или меланома. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак кожи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточный рак легкого.

[0160] СМ специфически расщепляется ферментом со скоростью примерно $0,001-1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250 или $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

[0161] Для специфического расщепления ферментом устанавливается контакт между ферментом и СМ, Когда АА или ВАА содержат по меньшей мере первый АВ, связанный с ММ и СМ. например, АА содержит АВ, связанный с ММ посредством СМ, в присутствии мишени и достаточной активности фермента, СМ может быть расщеплен. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с СМ и влиять на расщепление. Легко предположить, что фермент может находиться вблизи СМ, но не способен расщепляться из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

[0162] Примерные СМ данного раскрытия представлены в таблице 4 выше. В некоторых вариантах осуществления СМ имеет длину до 15 аминокислот, длину до 20 аминокислот, длину до 25 аминокислот, длину до 30 аминокислот, длину до 35 аминокислот, длину до 40 аминокислот, длину до 45 аминокислот, длину до 50 аминокислот, длину до 60 аминокислот, длиной в диапазоне 10–60 аминокислот, длину в диапазоне 15–60 аминокислот, длину в диапазоне 20–60 аминокислот, длину в диапазоне 25–60 аминокислот, длину в диапазоне 30–60 аминокислот, длину в диапазоне 35–60 аминокислот, длину в диапазоне 40–50 аминокислот, длину в диапазоне 45–60 аминокислот, длину в диапазоне 10–40 аминокислот, длина в диапазон 15–40 аминокислот, длину в диапазоне 20–40 аминокислот, длину в диапазоне 25–40 аминокислот, длину в диапазоне 30–40 аминокислот, длину в диапазоне 35–40 аминокислот, длину в диапазоне 10–30 аминокислот, длину в диапазоне 15–30 аминокислот, длину в диапазоне 20–30 аминокислот, длину в диапазоне 25–30 аминокислот, длину в диапазоне 10–20 аминокислот или длина в диапазоне 10–15 аминокислот.

8. Маскирующие фрагменты (ММ)

[0163] Как в активируемых моносpezifичных АА к CD3 и EGFR, так и в ВАА, описанных выше, АА/ВАА содержат ММ. В соответствии с описанием в данном документе, АА и ВАА по изобретению содержат продомен, который содержит ММ.

[0164] В некоторых вариантах осуществления ММ выбран для использования со специфическим антителом или фрагментом антитела.

[0165] В определенных вариантах осуществления ММ не является естественным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не содержит или практически не имеет гомологии с любым партнером по естественному связыванию АВ. В других вариантах осуществления ММ аналогичны любому природному связывающему партнеру АВ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%. В некоторых вариантах осуществления ММ идентичны любому природному связывающему партнеру АВ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 50% идентичны любому природному связывающему партнеру АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 25% идентичны любому природному связывающему партнеру АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 20% идентичны любому

природному связывающему партнеру АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 10% идентичны любому природному связывающему партнеру АВ.

[0166] Примерные ММ по настоящему изобретению могут иметь длину до 15 аминокислот, длину до 20 аминокислот, длину до 25 аминокислот, длину до 30 аминокислот, длину до 35 аминокислот, длину до 40 аминокислот, длину до 45 аминокислот, длину до 50 аминокислот, длину до 60 аминокислот, длиной в диапазоне 10–60 аминокислот, длину в диапазоне 15–60 аминокислот, длину в диапазоне 20–60 аминокислот, длину в диапазоне 25–60 аминокислот, длину в диапазоне 30–60 аминокислот, длину в диапазоне 35–60 аминокислот, длину в диапазоне 40–50 аминокислот, длину в диапазоне 45–60 аминокислот, длину в диапазоне 10–40 аминокислот, длина в диапазон 15–40 аминокислот, длину в диапазоне 20–40 аминокислот, длину в диапазоне 25–40 аминокислот, длину в диапазоне 30–40 аминокислот, длину в диапазоне 35–40 аминокислот, длину в диапазоне 10–30 аминокислот, длину в диапазоне 15–30 аминокислот, длину в диапазоне 20–30 аминокислот, длину в диапазоне 25–30 аминокислот, длину в диапазоне 10–20 аминокислот или длина в диапазоне 10–15 аминокислот, или длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[0167] Как предусмотрено в настоящем документе, ММ ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ связывает антигенсвязывающий домен АВ и ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ может стерически ингибировать связывание АВ с мишенью. ММ может аллостерически ингибировать связывание АВ с его мишенью. В таких вариантах осуществления, в которых АВ модифицирован или связан с ММ и в присутствии мишени связывание АВ с мишенью отсутствует. по существу отсутствует или составляет не более 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50% связывания АВ с мишенью в сравнении со связыванием АВ, не модифицированного или не связанного с ММ, родительского АВ или АВ, не связанного с ММ к мишени, в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении *in vivo* или в анализе *in vitro*.

[0168] При соединении АВ с ММ или при модификации им, ММ «маскирует» или уменьшает или иным образом ингибирует специфическое связывание АВ с мишенью. Когда АВ связан или изменен посредством ММ, такое соединение или модификация могут вызвать структурное изменение, которое уменьшает или подавляет способность АВ специфически связывать свою мишень.

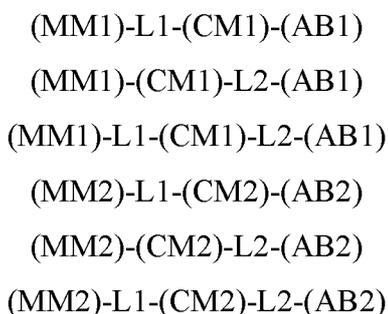
[0169] Примерные ММ данного раскрытия представлены в таблицах 3, 7 и 8 выше.

[0170] В любых из АА и ВАА, представленных в данном документе, маскированное АВ обладает меньшей аффинностью связывания по сравнению с немаскированным АВ.

9. Линкеры

[0171] Во многих вариантах осуществления может быть желательной вставка в конструкции АА/ВАА одного или нескольких линкеров, например гибких линкеров, для обеспечения гибкости в одном или нескольких соединениях ММ-СМ, соединение СМ-АВ/СМ-scFv или оба. Например, АВ, ММ и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser) для обеспечения желаемой гибкости. Таким образом, способность таких конструкций ВАА оставаться интактными (не активированными) или активированными, как описано в настоящем документе, может выиграть от введения одной или нескольких аминокислот для обеспечения гибкого линкера.

[0172] Например, в некоторых вариантах осуществления АА содержит одну из следующих формул (где приведенная ниже формула представляет аминокислотную последовательность в направлении от N-конца к С-концу или в направлении от С-конца к N-концу):



где ММ, СМ и АВ соответствуют определению выше; где каждый из L1 и L2 независимо и необязательно присутствуют или отсутствуют, представляют собой одинаковые или разные гибкие линкеры, которые включают по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly, Ser).

[0173] В некоторых вариантах осуществления ВАА содержит 2 тяжелые цепи, каждая из которых содержит структурное расположение (в направлении от N-конца к С-концу) HC MM2-CM2-AB2-AB1 и две легкие цепи, каждая из которых содержит структурное расположение (в направлении от N-конца к С-концу) MM1-CM1-AB1 LC.

[0174] В некоторых вариантах осуществления структура, включающая в себя линкеры, представлена на фиг. 17.

[0175] В некоторых вариантах (MM2)-L1-(CM2)-L2-(AB2) связан с тяжелой цепью АВ1, и АВ2 представляет собой scFv.

[0176] Линкеры, подходящие для использования в описанных в данном документе композициях, обычно представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированных АВ или АА для облегчения ингибирования связывания АВ с мишенью. Такие линкеры обычно называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую длину, такую как от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления подходящий линкер может иметь длину от 4 до 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления подходящий линкер может иметь длину от 5 до 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления подходящий линкер может иметь длину от 4 до 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления подходящий линкер может иметь длину от 5 до 20 аминокислот.

[0177] Примеры линкернов включают в себя глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 88) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 89), где n представляет собой целое число от единицы и более), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области. В некоторых вариантах осуществления n равно от около 1 до около 10, или от около 1 до около 9, или от около 1 до около 8, или от около 1 до около 7, или от около 1 до около 6, или от около 1 до от около 5, или от около 1 до около 4, или от около 1 до около 3, или от около 1 до около 2. Глицин и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут быть в состоянии выполнять функции нейтральной связи между компонентами. Для глицина доступно значительно больше фи-пси пространства, чем даже для аланина, и он значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173–142 (1992)). Примерные линкеры приведены в таблице 9-1.

Таблица 9-1. Примерные линкеры L1 и L2

| SEQ ID NO: | Аминокислотная последовательность линкера |
|---------------|---|
| SEQ ID NO: 88 | GSGGS |
| SEQ ID NO: 89 | GGGS |
| SEQ ID NO: 90 | GGSG |

| | |
|----------------|----------------------------|
| SEQ ID NO: 91 | GGSGG |
| SEQ ID NO: 92 | GSGSG |
| SEQ ID NO: 93 | GSGGG |
| SEQ ID NO: 94 | GGGSG |
| SEQ ID NO: 95 | GSSSG |
| SEQ ID NO: 96 | GSSGGS GGSGG |
| SEQ ID NO: 97 | GGGS |
| SEQ ID NO: 99 | GGGGS |
| SEQ ID NO: 100 | GSSGGS GGSGGSG |
| SEQ ID NO: 101 | GSSGGS GGSGGGGGS GGGS GGGS |
| SEQ ID NO: 102 | GSSGGS GGSGGSGGGSGGGSGGS |
| SEQ ID NO: 103 | GSSGT |
| SEQ ID NO: 104 | GGGSSGGS |

[0178] Специалист в данной области техники поймет, что конструкция AA может включать в себя линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать в себя гибкий линкер, а также одну или несколько частей, снижающих гибкость структуры для обеспечения желаемой структуры AA.

10. Конъюгация

[0179] В некоторых вариантах осуществления любое из антител или АВ описанных в настоящем документе AA и ВAA, может быть конъюгировано с агентом. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой обнаруживаемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой противоопухолевой агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгирован с АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент представляет собой ингибитор микротрубок. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, повреждающий нуклеиновую кислоту, такой как алкилятор ДНК или интеркалятор ДНК, или другой

агент, повреждающий ДНК. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, выбранный из группы, перечисленной в таблице 10.

Таблица 10. Типичные фармацевтические агенты для конъюгации

| <u>ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ</u> | |
|--|---|
| Ауристатины | турбостатин |
| Ауристин Е | Фенстатины |
| Монометил ауристин D (MMAD) | Гидроксифенстин |
| Монометил ауристин Е (MMAE) | Спонгистатин 5 |
| Десметил ауристин Е (DMAE) | Спонгистатин 7 |
| Ауристин F | Халистин 1 |
| Монометил ауристин F (MMAF) | Халистин 2 |
| Десметил ауристин F (DMAF) | Халистин 3 |
| Производные ауристина, например, их амиды. | Модифицированные бриостатины |
| Ауристин тирамин | Галокомстатин |
| Ауристин хиолин | Пирролобензимидазолы |
| Доластатины | Цибростатин-6 |
| Производные доластатина | Доксалиформ |
| Доластин 16 DmJ | Аналоги антрациклинов |
| Доластин 16 Dpv | |
| Мейтансиноиды, например DM-1; DM-4 | |
| Производные мейтансиноидов | Аналог цемадотина (CemCH ₂ -SH) |
| Дуокармицин | Вариант токсина А синегнойной палочки (PE38) |
| Производные дуокармицина | Вариант токсина А синегнойной палочки (ZZ-PE38) |
| Альфа-аманитин | ZJ-101 |
| Антрациклины | OSW-1 |

| | |
|---|--|
| Доксорубицин | 4-нитробензилоксикарбонильные производные Об-бензилгуанина |
| Даунорубицин | Ингибиторы топоизомеразы |
| Бриостатины | Гемиастерлин |
| Камптотецин | Цефалотаксин |
| Производные камптотецина | Гомогаррингтонин |
| 7-замещенный камптотецин | Пирролобензодиазепиновые димеры (ПБД) |
| 10, 11-дифторметилендиоксикамптотецин | Функционализированные пирролобензодиазепены |
| Комбретастатины | Калихеамицины |
| Дебромаплизиятоксин | Подофиллотоксины |
| Кахалалид-F | Таксаны |
| Дискодермолид | Алкалоиды барвинка |
| Эктеинасцидины | |
| | <u>СПОСОБНЫЕ К КОНЪЮГАЦИИ ОБНАРУЖИМЫЕ ФРАГМЕНТЫ</u> |
| <u>ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ</u> | Флуоресцеин и его производные |
| Ацикловир | Флуоресцеин изотиоцианат (FITC) |
| Вира А | |
| | <u>РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ</u> |
| Симметрел | ^{125}I |
| | ^{131}I |
| <u>ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ</u> | ^{89}Zr |
| Нистатин | ^{111}In |
| | ^{123}I |
| <u>ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ</u> | |
| Адриамицин | ^{131}I |
| Церубидин | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ |

| | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Блеомицин | ^{201}Tl |
| Алкеран | ^{133}Xe |
| Велбан | ^{11}C |
| Онковин | ^{62}Cu |
| Фторурацил | ^{18}F |
| Метотрексат | ^{68}Ga |
| Тиотепа | ^{13}N |
| Бизантрин | ^{15}O |
| Новантрон | ^{38}K |
| Тиогуанин | ^{82}Rb |
| Прокарбазин | $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (технеций) |
| Цитарабин | |
| | <u>ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ</u> |
| <u>АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ</u> | Барий |
| Аминогликозиды | Золото |
| Стрептомицин | Платина |
| Неомицин | |
| Канамицин | <u>АНТИМИКОПЛАЗМЕННЫЕ</u> |
| Амикацин | Тилозин |
| Гентамицин | Спектиномицин |
| Тобрамицин | |
| Стрептомицин В | |
| Спектиномицин | |
| Ампициллин | |
| Сульфаниламид | |
| Полимиксин | |
| Хлорамфеникол | |

[0180] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что большое разнообразие возможных фрагментов может быть связано с полученными в результате антителами, АА и ВАА по изобретению. (См., например, “Conjugate Vaccines”,

Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0181] В некоторых вариантах осуществления антитело, АА или ВАА содержит обнаруживаемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемый фрагмент представляет собой диагностический агент.

[0182] В некоторых вариантах осуществления антитело, АА или ВАА содержит одну или несколько дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления антитело, АА или ВАА содержит один или несколько лизинов. В некоторых вариантах осуществления антитело, АА или ВАА может быть сконструировано с возможностью включения одной или нескольких дисульфидных связей, или может быть сконструировано иным образом, с обеспечением возможности сайт-специфической конъюгации.

11. Получение

[0183] Раскрытие также предоставляет выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело, АА или ВАА, описанные в данном документе, а также векторы, которые включают такие выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Раскрытие предоставляет способы получения антитела, АА или ВАА путем культивирования клетки в условиях, приводящих к экспрессии антитела, АА или ВАА, где клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты.

[0184] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рLW289. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рLW246. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рLW307. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рLW291. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рLW352. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рLW353. (Такие векторы и описаны, и последовательности представлены ниже в примере 1)

12. Использование антител, АА, биспецифических антител и ВАА

[0185] В некоторых вариантах осуществления антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА могут использоваться в качестве терапевтических агентов. Такие агенты обычно используются для лечения, облегчения и/или предотвращения заболевания или патологии у субъекта. Схема лечения реализуется путем идентификации у субъекта,

например, пациента или другого млекопитающего, наличия (или наличия риска развития) расстройства с использованием стандартных методов.

[0186] Введение антител/биспецифических антител/АА/ВАА может подавлять или ингибировать или нарушать сигнальную функцию одной или нескольких мишеней.

[0187] Понятно, что введение терапевтических препаратов в соответствии с раскрытием будет осуществляться с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и тому подобного. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, глава 87 авторства Vlaug, Seymour, вышеуказанного источника. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как Lipofectin™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеуказанных смесей может быть подходящей в лечении и терапии, как описано в данном раскрытии, при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым и переносимым в отношении способа введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery—some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) и ссылки на них для получения дополнительной информации, касающейся составов, эксципиентов и носителей, хорошо известных химикам-фармацевтам.

[0188] Как правило, облегчение или лечение заболевания или расстройства включает уменьшение одного или нескольких симптомов или медицинских проблем, связанных с заболеванием или расстройством. Например, в случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может достигать одного или сочетания следующего: уменьшение количества раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование (то есть, уменьшение до некоторой степени и/или прекращение) инфильтрации раковых клеток в периферические органы; ингибирование метастазирования опухоли; ингибирования до некоторой степени роста опухоли; и/или ослабление до некоторой степени одного или несколько симптомов, связанных с раком. В некоторых вариантах

осуществления композицию по данному раскрытию можно использовать для предотвращения возникновения или повторного возникновения заболевания или расстройства у субъекта, например человека или другого млекопитающего, такого как примат, не являющийся человеком, домашнее животное (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное из зоопарка. Термины «субъект» и «пациент» применяют в данном документе взаимозаменяемо.

[0189] Терапевтически эффективное количество антител/биспецифических антител/АА/ВАА по изобретению, как правило, относится к количеству, необходимому для достижения терапевтической цели.

[0190] Обычные диапазоны терапевтически эффективных доз антител/биспецифических антител/АА/ВАА, раскрытых в настоящем описании, в качестве неограничивающего примера могут составлять от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела. Общая частота введения доз может варьироваться, например, от двух раз в день до одного раза в неделю.

[0191] Эффективность лечения определяется посредством любого известного способа диагностики или лечения конкретного расстройства. Способы скрининга антител/биспецифических антител/АА/ВАА, которые обладают желаемой специфичностью, включают, но не ограничиваются ими, иммуноферментный анализ (ИФА) и другие иммунологически опосредованные методики, известные в данной области.

[0192] Другие предполагаемые виды использования включают диагностику, визуализацию, прогнозирование и обнаружение. В некоторых вариантах осуществления антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА используются в известных в данной области техники способах, связанных с локализацией и/или количественным определением мишени (например, для использования при измерении уровней одной или нескольких мишеней в соответствующих физиологических образцах, для использования в диагностических методах, для использования при визуализации белка и т. п.).

[0193] В некоторых вариантах осуществления антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА используются для выделения одной или нескольких мишеней стандартными методами, такими как иммуноаффинность, хроматография или иммунопреципитация. Антитело, АА, биспецифическое антитело или ВАА можно использовать диагностически для мониторинга уровней белка в ткани как часть процедуры клинического тестирования, например, для определения эффективности данного режима лечения. Обнаружение может быть облегчено путем связывания (т.е. физического связывания) антитела с обнаруживаемым веществом. Примеры

обнаруживаемых веществ включают различные ферменты, протезные группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, β -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов протетической группы включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных материалов включают умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин, изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин, флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного материала включает люминол; примеры биолюминесцентных материалов включают люциферазу, люциферин и экворин, а примеры подходящих радиоактивных материалов включают ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H .

[0194] В еще одном варианте осуществления антитело, биспецифическое антитело, АА, ВАА, направленное на две или более мишеней, можно использовать в качестве агента для обнаружения присутствия одной или нескольких мишеней (или их фрагмента) в образце. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит обнаруживаемую метку. Антитела являются поликлональными или, в некоторых вариантах осуществления, моноклональными. Используют интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv или F(ab')₂). Термин «маркированный» в отношении зонда или антитела предназначен для описания непосредственной маркировки зонда или антитела путем связывания (то есть физического связывания) обнаружимого вещества с зондом или антителом, а также косвенной маркировки зонда или антитела посредством их реактивности с другим реагентом, который является непосредственно маркированным. Примеры косвенной маркировки включают детекцию первичного антитела с использованием флуоресцентно маркированного вторичного антитела и концевая маркировка антитела биотином таким образом, чтобы его можно было обнаружить с помощью флуоресцентно маркированного стрептавидина. Предполагается, что термин «биологический образец» включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные у субъекта, а также ткани, клетки и жидкости, присутствующие в субъекте. Поэтому в термин «биологический образец» входит кровь и ее фракция или компонент, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Таким образом, способ обнаружения по настоящему изобретению можно использовать для обнаружения белка в биологическом образце как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, методы обнаружения белка аналита *in vitro* включают иммуноферментные анализы (ИФА), вестерн-блоты, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. Процедуры проведения иммуноанализа описаны, например, в «ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology», Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.)

Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Кроме того, методики *in vivo* для обнаружения анализируемого белка включают введение субъекту меченого антитела к анализируемому белку. Например, антитело может быть маркировано радиоактивной меткой, присутствие и местоположение которой у субъекта можно обнаружить стандартными методами визуализации.

[0195] Антитела, биспецифические антитела, АА и биспецифические антитела по изобретению также применимы в различных диагностических и профилактических составах. В одном варианте осуществления антитело, АА, биспецифическое антитело, ВАА вводят пациентам, которые подвергаются риску развития одного или нескольких из вышеупомянутых расстройств. Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким расстройствам может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

[0196] В другом варианте осуществления изобретения антитело, АА, биспецифическое антитело, ВАА вводят людям, у которых диагностировано клиническое показание, связанное с одним или несколькими из вышеупомянутых нарушений. После постановки диагноза антитело, АА, биспецифическое антитело, ВАА может вводиться для смягчения или обращения эффектов клинических показаний.

[0197] Антитела, биспецифические антитела, АА и ВАА также применимы для обнаружения одной или нескольких мишеней в образцах пациентов и, соответственно, полезны в качестве диагностики. Например, антитела, биспецифические антитела, АА и ВАА по изобретению используются в анализах *in vitro*, например, ИФА, для выявления уровней одной или нескольких мишеней в образце пациента.

[0198] В одном варианте осуществления антитело, АА, биспецифическое антитело, ВАА иммобилизовано на твердой подложке (например, в лунках планшета для микротитрования). Иммобилизованное антитело и/или АА служит в качестве захватывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед контактом иммобилизованного антитела/АА с образцом пациента твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

[0199] Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки, взятый у субъекта, у

которого подозревается наличие циркулирующего антигена на уровне, который считается диагностическим признаком патологии. После промывки тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, которое может быть обнаружимо маркировано. Маркированное второе антитело выполняет функции обнаруживающего антитела. Измеряется уровень обнаруживаемой метки и концентрация целевых антигенов в тестируемом образце определяется путем сравнения со стандартной кривой, полученной из стандартных образцов.

[0200] Понятно, что на основании результатов, полученных с использованием антитела, АА, биспецифического антитела, ВАА в диагностическом анализе *in vitro*, возможно выявить заболевание у субъекта на основании уровней экспрессии целевых антигенов. Для определенного заболевания отбирают образцы крови у субъектов, у которых диагностированы различные стадии развития заболевания и/или различные этапы терапевтического лечения заболевания. Используя популяцию образцов, которая дает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, определяется диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

[0201] Антитела, биспецифические антитела, АА и ВАА также могут быть использованы в способах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, АА и биспецифические антитела, имеющие ферментативно расщепляемый СМ, можно использовать для обнаружения присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие АА и биспецифические антитела можно использовать в диагностике, которая может включать в себя определение *in vivo* (например, качественное или количественное) ферментативной активности (или, в некоторых вариантах осуществления, среды с повышенным восстановительным потенциалом, такие как среда, которая может обеспечить восстановление дисульфидной связи) путем измерения накопления активированных или биспецифических активированных антител (т. е. антител или биспецифических антител, возникающих в результате расщепления АА или ВАА) в данной клетке или ткани данного организма-хозяина. Такое накопление активированных биспецифических антител указывает не только на то, что ткань проявляет ферментативную активность (или повышенный восстановительный потенциал в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань

экспрессирует по меньшей мере одну мишень, с которой связывается активированное биспецифическое антитело.

[0202] Например, СМ может быть выбран в качестве субстрата протеазы для протеазы, обнаруженной в месте опухоли, в месте вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном месте (например, в виде абсцесса в органе и т. п.) и т. п. По меньшей мере один из АВ может быть таким, который связывает целевой антиген. Используя методы, знакомые специалисту в данной области, обнаруживаемая метка (например, флуоресцентная метка или радиоактивная метка или радиотрекер) может быть конъюгирована с АВ или другим участком антитела, АА, биспецифического антитела, ВАА. Подходящие обнаруживаемые метки обсуждаются в контексте вышеупомянутых способов скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. При использовании по меньшей мере одного АВ, специфичного для белка или пептида болезненного состояния, наряду с протеазой, активность которой повышена в интересующей пострадавшей от заболевания ткани, АА будут демонстрировать повышенную скорость связывания с пострадавшей от заболевания тканью по сравнению с тканями, в которых специфический фермент СМ не присутствует на обнаружимом уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пострадавшей от заболевания ткани, или неактивен (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку малые белки и пептиды быстро выводятся из крови почечной фильтрационной системой, а также потому что фермент, специфичный для СМ, не присутствует на обнаружимом уровне (или присутствует на более низких уровнях в тканях, не пострадавших от заболевания, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных биспецифических антител в пострадавшей от заболевания ткани повышается по сравнению с не пострадавшими от заболевания тканями.

[0203] В другом примере антитела, антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА по настоящему изобретению могут использоваться для обнаружения присутствия или отсутствия в образце расщепляющего агента. Например, если антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА содержат СМ, восприимчивый к расщеплению ферментом, ВАА могут быть использованы для обнаружения (качественно или количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, когда антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА содержат СМ, восприимчивый к расщеплению восстанавливающим агентом, антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА можно использовать для обнаружения (качественно или количественно) присутствия условий восстановления в образце. Для облегчения анализа при таких способах антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА могут быть обнаружимо маркированы и могут быть связаны с

подложкой (например, твердой подложкой, такой как предметное стекло или сфера). Обнаруживаемая метка может быть расположена на части антител/биспецифических антител/АА/ВАА, которая не высвобождается после расщепления, например, обнаруживаемая метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не обнаруживается до тех пор, пока не произойдет расщепление. Анализ может проводиться, например, путем контактирования иммобилизованных обнаружимых меченых антител/биспецифических антител/АА/ВАА с образцом, предположительно содержащим фермент и/или восстанавливающий агент, в течение времени, достаточного для инициации расщепления, с последующей промывкой для удаления избытка образца и загрязняющих веществ. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента (например, фермента или восстановителя) в образце затем оценивают по изменению обнаружимого сигнала антител/биспецифических антител/АА/ВАА до контакта с образцом, например, по наличию и/или увеличению обнаружимого сигнала вследствие расщепления антител/биспецифических антител/АА/ВАА расщепляющим агентом в образце.

[0204] Такие способы обнаружения могут быть адаптированы с возможностью обнаружения присутствия или отсутствия мишени, которая способна связывать по меньшей мере один АВ из антител/биспецифических антител/АА/ВАА по настоящему изобретению. Таким образом, анализы могут быть адаптированы для оценки наличия или отсутствия расщепляющего агента и наличия или отсутствия интересующей мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего агента может быть обнаружено по присутствию и/или увеличению обнаруживаемых уровней меток антител/биспецифических антител/АА/ВАА, как описано выше, а присутствие или отсутствие мишени может быть обнаружено путем обнаружения комплекса мишень-АВ, например, путем использования обнаружимо маркированного антитела к мишени.

[0205] АА/ВАА по настоящему изобретению также полезны для визуализации *in situ* для подтверждения активации АА, например, путем протеазного расщепления и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* — это методика, позволяющая локализовать протеолитическую активность и мишень в биологических образцах, таких как клеточные культуры или срезы тканей. Используя эту методику, можно подтвердить как связывание с данной мишенью, так и протеолитическую активность на основании наличия обнаруживаемой метки (например, флуоресцентной метки).

[0206] Эти методики полезны для любых замороженных клеток или тканей, полученных из участка заболевания (например, опухолевой ткани) или здоровых тканей. Эти методики также полезны для свежих образцов клеток или тканей.

[0207] В этих методик АА/ВАА помечается обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка может представлять собой флуоресцентный краситель (например, флуорофор, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель ближней инфракрасной области спектра (NIR) (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и амплифицирующий реагент, такой как стрептавидин, или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

[0208] Обнаружение метки в образце, который был инкубирован с маркированными АА или ВАА указывает на то, что образец содержит мишень и содержит протеазу, специфичную для СМ АА или ВАА по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы может быть подтверждено с использованием ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как описанные в данном документе, и/или с использованием специфичного для протеазы агента, например, антитела, такого как А11, которое специфично для протеазы матриптазы (MT-SP1) и ингибирует протеолитическую активность MT-SP1; см., например, международную публикацию № WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 г. Тот же подход с использованием ингибиторов протеазы широкого спектра действия, таких как описанные в данном документе, и/или с использованием более селективного ингибирующего агента, может быть использован для идентификации протеазы или класса протеаз, специфичных для СМ АА или ВАА по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени может быть подтверждено с использованием агента, который является специфичным для мишени, или обнаруживаемая метка может конкурировать с немаркированной мишенью. В некоторых вариантах осуществления может быть использовано немаркированное АА с обнаружением посредством маркированного вторичного антитела или более сложной системы обнаружения.

[0209] Подобные методики также полезны для визуализации *in vivo*, когда обнаружение флуоресцентного сигнала у субъекта, например млекопитающего, включая человека, указывает, что участок заболевания содержит мишень и содержит протеазу, специфичную для СМ АА или ВАА настоящего раскрытия.

[0210] Такие методики также полезны в наборах и/или в качестве реагентов для обнаружения, идентификации или характеристики протеазной активности в различных клетках, тканях и организмах на основе протеазоспецифичных СМ в АА или ВАА по настоящему изобретению.

13. Терапевтическое введение

[0211] Понятно, что введение терапевтических препаратов в соответствии с раскрытием будет осуществляться с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые включены в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и тому подобного. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, глава 87 авторства Blaug, Seymour, вышеуказанного источника. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как Lipofectin™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеуказанных смесей может быть подходящей в лечении и терапии, как описано в данном раскрытии, при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется составом, и состав является физиологически совместимым и переносимым в отношении способа введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) и ссылки на них для получения дополнительной информации, касающейся составов, эксципиентов и носителей, хорошо известных химикам-фармацевтам.

[0212] В некоторых вариантах осуществления антитела, биспецифические антитела, АА или ВАА (или их конъюгированные композиции) вводят в сочетании с одним или несколькими дополнительными агентами или с комбинацией дополнительных агентов. Подходящие дополнительные агенты включают современные фармацевтические и/или хирургические методы лечения для предполагаемого применения. Например, они могут использоваться в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или противоопухолевым средством.

[0213] В некоторых вариантах осуществления антитела, биспецифические антитела, АА или ВАА (или их конъюгированные композиции) по настоящему изобретению вводят в сочетании с одним или несколькими дополнительными агентами, выбранными из группы, состоящей из антител, конъюгированных антител, АА, конъюгированных АА, биспецифических антител, конъюгированных биспецифических антител, ВАА или конъюгированных ВАА. В некоторых вариантах осуществления часть антитела любого из

указанных выше дополнительных агентов направлена против мишени, такой как одна или несколько мишеней, раскрытых в таблице 9. Понятно, что в некоторых вариантах осуществления часть антитела представленных в настоящем изобретении антител, биспецифических антител, АА или ВАА (или их конъюгированных композиций) и часть антитела дополнительного агента направлены против одной и той же мишени (например, обе могут быть нацелены на EGFR). В некоторых вариантах осуществления они направлены против одной и той же мишени, но нацелены на разные эпитопы. В некоторых вариантах осуществления они направлены против совершенно различных мишеней (например, активируемое антитело по настоящему изобретению, которое нацелено на EGFR, может вводиться в сочетании с АА, нацеленным на другую мишень; аналогично, например, ВАА по настоящему изобретению нацелено на EGFR, а CD3 может назначаться в сочетании с АА, нацеленным на другую мишень.

[0214] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, биспецифические антитела, АА или ВАА (или их конъюгированные композиции) по изобретению вводят в сочетании с иммунотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, биспецифические антитела, АА или ВАА (или их конъюгированные композиции) по настоящему изобретению вводят в сочетании с химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, биспецифические антитела, АА или ВАА (или их конъюгированные композиции) по изобретению вводят в сочетании с иммунотерапевтическим агентом и с химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных агентов вводят с любым из таких вариантов осуществления комбинации.

[0215] В некоторых вариантах осуществления они составлены в одну терапевтическую композицию, и антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА и дополнительный агент вводят одновременно. Альтернативно, антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА вводят отдельно друг от друга, например, каждое из них составлено в отдельную терапевтическую композицию, и антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА и их дополнительный агент вводят одновременно или антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА и дополнительный агент вводят в разное время в соответствии с назначенной схемой лечения. Антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА и их дополнительный агент могут быть введены в нескольких дозах.

[0216] Антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Принципы и соображения, связанные с приготовлением таких композиций, а также рекомендации по выбору

компонентов приведены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

[0217] Такие композиции обычно содержат антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА и фармацевтически приемлемый носитель.

[0218] Используемый в данном описании, термин «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любых и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и задерживающие абсорбцию средств и т. п., совместимых с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в последнем издании Remington Pharmaceutical Sciences, стандартный справочный текст в данной области, который включен в настоящее описание посредством ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничиваются ими, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% сывороточный альбумин человека. Также могут быть использованы липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и средств в отношении фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или вещества являются несовместимыми с активным соединением, предусматривается их применение в композициях.

[0219] Составы, предназначенные для введения *in vivo* должны быть стерильными. Данное условие легко достижимо проведением фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

[0220] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению изготовлена совместимой с предполагаемым путем ее введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (т. е., местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутрикожного или подкожного могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУ); буферы, такие как

ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. РН можно регулировать с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Препарат для парентерального применения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или сосуды для нескольких доз из стекла или пластмассы.

[0221] Фармацевтические композиции, подходящие для применения в виде инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимости) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Sterophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, что она должна легко выходить из шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. д.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предупреждение действия микроорганизмов можно выполнять посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях в композицию надлежит включать изотонические вещества, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию вещества, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0222] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или несколькими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией с фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный базовый раствор, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка,

которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

[0223] Пероральные композиции обычно включают в себя инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения активное соединение может быть объединено с эксципиентами и использовано в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также могут быть получены с использованием жидкости-носителя для использования в качестве жидкости для полоскания рта, при этом соединение в жидком носителе применяют перорально, полощут им рот и выплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связывающие вещества и/или адьювантные материалы могут быть включены в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобное могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединений подобного рода: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующее вещество, такое как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подслащивающее вещество, такое как сахароза или сахарин; или вкусовое вещество, такое как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[0224] Для введения путем ингаляции соединения доставляются в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или из распылителя.

[0225] Системное введение также может быть выполнено через слизистую или через кожу. Для введения через слизистую или трансдермального введения в составе могут использоваться проникающие вещества, подходящие для барьера, через который необходимо проникнуть. Такие смачивающие вещества обычно известны в данной области техники, и включают в себя, например, вещества для введения через слизистую, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Введение через слизистую может быть осуществлено за счет использования назальных спреев или суппозиторияев. Для трансдермального введения активные соединения изготавливают в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как в целом известно в данной области техники.

[0226] Соединения также могут быть приготовлены в форме суппозитория (например, с обычными основами для суппозитория, таких как масло какао и другие глицериды) или клизм с удержанием для ректальной доставки.

[0227] В одном варианте осуществления изобретения активные соединения готовят с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, например, составы с замедленным/контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут очевидны специалистам в данной области техники.

[0228] Например, активный ингредиент также может быть заключено в микрокапсуле, приготовленной, например, методами коацервации или полимеризации на границе фаз, например, микрокапсуле из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсуле из поли(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях.

[0229] Могут быть изготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем матрицы представлены в форме, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц длительного высвобождения включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (пат. США № 3,773,919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, обеспечивают возможность высвобождения молекул дольше 100 суток, определенные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

[0230] Материалы также могут быть получены коммерчески у компаний Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) и также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых

носителей. Их можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[0231] В частности, может быть выгодным приготовление композиций для перорального или парентерального введения в единичной дозированной форме для удобства введения и однородности дозировки. В контексте данного документа единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозровок для подлежащего лечению субъекта; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимое терапевтическое действие, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификации для единичных дозированных форм согласно раскрытию обусловлены и напрямую зависят от уникальных характеристик активного соединения и конкретного достигаемого терапевтического действия, и ограничений, свойственных области техники составления соединений, например, активного соединения для лечения индивидов.

[0232] Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкцией по применению.

[0233] Препарат также может содержать более одного активного соединения, которое необходимо для конкретного показания, подвергаемого лечению, например, с дополнительными вариантами активности, которые не оказывают вредного влияния друг на друга. Альтернативно или в дополнение, композиция может содержать агент, который усиливает ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или агент, ингибирующий рост. Такие молекулы присутствуют в надлежащей комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемого применения.

[0234] В одном варианте осуществления активные соединения вводят в составе комбинированной терапии, то есть, в сочетании с другими агентами, например терапевтическими агентами, которые применимы для лечения патологических состояний или расстройств, таких как аутоиммунные расстройства и воспалительные заболевания. Термин «в комбинации» в данном контексте означает, что агенты вводятся по существу одновременно, либо одновременно, либо последовательно. При последовательном введении, на начало введения второго соединения, первое из двух соединений все еще обнаруживается в эффективных концентрациях в месте лечения.

[0235] Например, комбинированная терапия может включать одно или несколько антител/биспецифических антител/АА/ВАА по настоящему изобретению, которые комбинированы и/или вводятся совместно с одним или несколькими дополнительными

терапевтическими агентами, например, одним или несколькими ингибиторами цитокинов и факторов роста, иммунодепрессантами, противовоспалительными агентами, ингибиторами метаболизма, ингибиторами ферментов и/или цитотоксическими или цитостатическими агентами, как более подробно описано ниже. Кроме того, одно или несколько антител/биспецифических антител/АА/ВАА, описанных в данном документе, могут использоваться в комбинации с двумя или более терапевтическими агентами, описанными в данном документе (например, одно ВАА, введенный с другим ВАА или АА согласно изобретению, и тому подобное). Такая комбинированная терапия может преимущественно использовать более низкие дозы вводимых терапевтических агентов, таким образом избегая возможных токсических эффектов или осложнений, связанных с различными монотерапиями.

[0236] В других вариантах осуществления одно или несколько антител по изобретению могут быть скомбинированы с и/или совместно введены с одним или несколькими противовоспалительными лекарственными средствами, иммунодепрессантами или метаболическими или ферментативными ингибиторами. Неограничивающие примеры препаратов или ингибиторов, которые можно использовать в комбинации с антителами, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, один или несколько из: нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), например ибупрофен, тенидап, напроксен, мелоксикам, пироксикам, диклофенак и индометацин; сульфасалазин; кортикостероиды такие как преднизолон; противовоспалительные препараты, подавляющий цитокины (CSAID); ингибиторы биосинтеза нуклеотидов, например ингибиторы биосинтеза пурина, антагонисты фолата (например, метотрексат (N-[4-[(2,4-диамино-6-птеридинил)метил]метиламино]бензоил]-L-глутаминовая кислота); и ингибиторы биосинтеза пиримидина, например ингибиторы дигидрооротатдегидрогеназы (DHODH). Подходящие терапевтические агенты для применения в комбинации с антителами по изобретению включают NSAID, CSAID, ингибиторы (DHODH) (например, лефлуномид) и антагонисты фолата (например, метотрексат).

[0237] Примеры дополнительных ингибиторов включают один или несколько из следующих: кортикостероиды (для перорального, ингаляционного и местного введения); иммунодепрессанты, например, циклоспорин, такролимус (FK-506); и ингибиторы mTOR, например, сиролимус (рапамицин-RAPAMUNETM или производные рапамицина, например, растворимые производные рапамицина (например, сложноэфирные производные рапамицина, например, CCI-779); агенты, которые препятствуют передаче сигналов провоспалительными цитокинами, такими как TNF α или IL-1 (например,

ингибиторы IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP киназы); ингибиторы COX2, например целекоксиб, рофекоксиб и их варианты; ингибиторы фосфодиэстеразы, например R973401 (ингибитор фосфодиэстеразы типа IV); ингибиторы фосфолипазы, например ингибиторы цитозольной фосфолазы 2 (сPLA2) (например, аналоги трифторметилкетона); ингибиторы фактора роста эндотелиальных клеток сосудов или рецептора фактора роста, например ингибитор VEGF и/или ингибитор VEGF-R, и ингибиторы ангиогенеза. Подходящими терапевтическими агентами для применения в комбинации с антителами по изобретению являются иммунодепрессанты, например, циклоспорин, такролимус (FK-506); ингибиторы mTOR, например производные сиролимуса (рапамицина) или рапамицина, например растворимые производные рапамицина (например, сложные эфиры производных рапамицина, например CCI-779); Ингибиторы COX2, например целекоксиб и его варианты; и ингибиторы фосфолипазы, например ингибиторы цитозольной фосфолипазы 2 (сPLA2), например аналоги трифторметилкетона.

[0238] Дополнительные примеры терапевтических агентов, которые можно комбинировать с антителом по настоящему изобретению, включают одно или несколько из следующих: 6-меркаптопурины (6-МП); азатиопринсульфасалазин; месалазин; олсалазин; хлорохин/гидроксихлорохин (PLAQUENIL[®]); пеницилламин; ауротиорналят (внутримышечно и перорально); азатиоприн; койхицин; агонисты бета-2 адренорецепторов (сальбутамол, тербуталин, сальметерал); ксантины (теофиллин, арнинофиллин); кромогликат; недокромил; кетотифен; ипратропий и окситропий; микофенолят мофетил; агонисты аденозина; антитромботические агенты; ингибиторы комплемента; и адренергические агенты.

[0239] В некоторых вариантах осуществления антитела/биспецифические антитела/АА/ВАА по изобретению могут быть объединены с одним или несколькими антителами/биспецифическими антителами/АА/ВАА.

14. Комплекты и производимые изделия

[0240] В данном разделе предоставлены наборы и производимые изделия, содержащие любое одно или несколько антител, АА, биспецифических антител и ВАА, представленных в данном документе.

[0241] Наборы и производимые изделия могут содержать любое одно или несколько из антител, АА, биспецифических антител и ВАА, представленных в данном документе, в формате, подходящем для хранения или доставки.

[0242] Наборы и производимые изделия могут содержать по меньшей мере второй компонент.

[0243] Наборы и производимые изделия могут содержать сосуд, разбавитель, растворитель, вторую композицию или любой компонент, подходящий для преобразования пригодной для хранения композиции в пригодную для использования композицию в раскрытом в данном документе способе, в случае, если такое преобразование необходимо. Способ может представлять собой, например, терапевтический способ, раскрытый в данном документе. Набор может содержать инструкции для применения.

[0244] Наборы и производимые изделия для производства могут содержать агент в соответствии с описанием в данном документе, например цитотоксический агент или обнаружимую метку, в формате, подходящем для конъюгации с антителами, АА, биспецифическими антителами и ВАА, представленными в данном документе.

[0245] Следующие примеры включены в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения охвата изобретения.

ПЕРЕЧИСЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0246] Изобретение может быть определено посредством ссылки на следующие перечисленные иллюстративные варианты осуществления.

[0247] 1. Биспецифическое активируемое антитело (ВАА), причем указанное ВАА при активации специфически связывается с двумя мишенями и имеет следующую структуру:

а. антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, где АВ1 содержит две тяжелые цепи (АВ1 НС) и две легкие цепи (АВ1 LC); и где АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, где карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, где

ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и

СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,

б. два scFv (каждый АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, где каждый АВ2 содержит переменную область легкой цепи, связанную с переменной областью тяжелой цепи, где карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и где каждый АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2), с образованием конструкции ММ2-СМ2, где карбоксильный конец каждой конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, где

ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и

СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

и причем ВАА имеет по меньшей мере одну из следующих характеристик:

i. ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

ii. ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7;

iii. АВ2 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4; и

iv. АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0248] 2. ВАА по варианту осуществления 1, в котором АВ2 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и вариабельный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.

[0249] 3. ВАА по варианту осуществления 1, в котором АВ1 связывает опухолевую мишень, а АВ2 связывает мишень иммунного эффектора.

[0250] 4. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–3, в котором ВАА представляет собой биспецифическое активирующее Т-клетки (TCB) АА (ТСВАА).

[0251] 5. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором АВ1 связывает EGFR, а АВ2 связывает CD3ε.

[0252] 6. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–5, в котором ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, представленных в таблице 7.

[0253] 7. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–5, в котором ММ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85 и SEQ ID NO: 78.

[0254] 8. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–5, в котором ММ1 содержит SEQ ID NO: 78.

[0255] 9. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–8, в котором ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

- [0256] 10. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–9, в котором СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.
- [0257] 11. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–9, в котором СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.
- [0258] 12. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–9, в котором СМ такого СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
- [0259] 13. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–9, в котором СМ1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 16.
- [0260] 14. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–9, в котором СМ2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, содержащей SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 17.
- [0261] 15. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–14, в котором АВ1 содержит аминокислотные замены по меньшей мере в двух положениях аминокислот L234, L235 и P331.
- [0262] 16. ВАА по варианту осуществления 15, в котором АВ1 содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234, L235 и P331.
- [0263] 17. ВАА по варианту осуществления 15, в котором АВ1 содержит аминокислотные замены L234F, L235E и P331S.
- [0264] 18. ВАА по варианту осуществления 15, в котором АВ1 содержит область Fc, содержащую аминокислотную замену в N297.
- [0265] 19. ВАА по любому из вариантов осуществления 1–14, в котором АВ1 содержит аминокислотные замены в положениях аминокислот L234F, L235E, P331S и N297Q.
- [0266] 20. ВАА по варианту осуществления 1, в котором тяжелая цепь АВ1 содержит любую из SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, приведенные в таблице 6.
- [0267] 21. ВАА CI106, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1.
- [0268] 22. ВАА CI107, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1.
- [0269] 23. ВАА CI079, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1.
- [0270] 24. ВАА CI090, содержащее структуру и последовательность в соответствии с указанным в таблице 11 и примере 1.

[0271] 25. Активируемое антитело (АА), содержащее:

а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3 (CD3 ϵ);

б) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, причем ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с CD3 ϵ , когда АА находится в нерасщепленном состоянии; при этом ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и

с) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

[0272] 26. АА по варианту осуществления 25, в котором СМ содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 4.

[0273] 27. АА по варианту осуществления 25, в котором СМ включает субстрат, расщепляемый сериновой протеазой или MMP.

[0274] 28. АА по варианту осуществления 25, в котором СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18–56.

[0275] 29. АА по варианту осуществления 25, в котором протеаза представляет собой MMP.

[0276] 30. АА по варианту осуществления 25, в котором протеаза представляет собой сериновую протеазу.

[0277] 31. АА по варианту осуществления 25, в котором АВ, который специфически связывается с CD3, представляет собой антитело по любому из вариантов осуществления 38–47.

[0278] 32. Активируемое антитело (АА), содержащее:

а. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR);

б. маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, где ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с EGFR, когда АА находится в нерасщепленном состоянии, и где ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей представленных в таблице 7; и

с. расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

[0279] 33. АА по варианту осуществления 32, в котором ММ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

[0280] 34. АА по любому из вариантов осуществления 32–33, в котором СМ содержит субстрат, расщепляемый сериновой протеазой или MMP.

- [0281] 35. АА по любому из вариантов осуществления 32–33, в котором СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18–56.
- [0282] 36. АА по варианту осуществления 32, в котором СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.
- [0283] 37. АА по варианту осуществления 32, в котором СМ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.
- [0284] 38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3 (CD3ε), где антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.
- [0285] 39. АВ по варианту осуществления 38, в котором антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.
- [0286] 40. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2.
- [0287] 41. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3.
- [0288] 42. АВ по варианту осуществления 38, в котором антитело содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.
- [0289] 43. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.
- [0290] 44. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.
- [0291] 45. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.
- [0292] 46. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.
- [0293] 47. АВ по варианту осуществления 38, содержащий переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0294] 48. АВ по любому из вариантов осуществления 32–47, в котором АВ представляет собой биспецифическое АВ.

[0295] 49. АА по любому из вариантов осуществления 32–47, в котором антитело представляет собой scFv.

[0296] 50. АА по любому из вариантов осуществления 32–47, в котором антитело представляет собой антитело IgG1.

[0297] 51. Активируемое антитело (АА), содержащее:

а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), который специфически связывается с эpsilon-цепью CD3 (CD3ε), причем антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, или содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4;

б) маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, где ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с CD3ε, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и

в) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

[0298] 52. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2.

[0299] 53. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3.

[0300] 54. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0301] 55. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0302] 56. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0303] 57. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 1.

[0304] 58. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 2, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0305] 59. АА по варианту осуществления 51, в котором АВ содержит переменный домен тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, как указано в SEQ ID NO: 4.

[0306] 60. АА по любому из вариантов осуществления 51–59, в котором ММ содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 3.

[0307] 61. АА по любому из вариантов осуществления 51–59, в котором СМ содержит любую одну из последовательностей, указанных в таблице 4.

[0308] 62. Биспецифическое активируемое антитело (ВАА), содержащее любое из АА в соответствии с вариантами осуществления 51–61.

[0309] 63. Активируемое антитело (АА), содержащее:

а. антитело (АВ), которое специфически связывается с мишенью, где антитело представляет собой антитело IgG1, и где область Fc антитела содержит аминокислотную замену в аминокислотных положениях L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет пониженную эффекторную функцию;

б. маскирующий фрагмент (ММ), связанный с АВ, где ММ уменьшает или ингибирует связывание АВ с мишенью, когда АА находится в нерасщепленном состоянии; и

с. расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с АВ, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для протеазы.

[0310] 64. АА по варианту осуществления 63, в котором область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в положениях аминокислот L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что АА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0311] 65. АА по варианту осуществления 63 или 64, в котором мишень выбрана из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0312] 66. биспецифическое активируемое антитело (ВАА), содержащее:

а. антитело IgG (АВ1), которое специфически связывается с первой мишенью, где АВ1 содержит две тяжелые цепи (АВ1 HC) и две легкие цепи (АВ1 LC); и где АВ1 связан с первым маскирующим фрагментом (ММ1), связанным с первым расщепляемым фрагментом (СМ1) с образованием конструкции ММ1-СМ1, где карбоксильный конец конструкции ММ1-СМ1 связан с каждым аминоконцом каждой легкой цепи АВ1, где

ММ1 ингибирует связывание АВ1 с его мишенью; и

СМ1 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для первой протеазы,

b. два scFv (каждый АВ2), каждый из которых специфически связывается со второй мишенью, где каждый АВ2 содержит переменную область тяжелой цепи, связанную с переменной областью легкой цепи, где карбоксильный конец каждого АВ2 связан с аминоконцом каждой из тяжелых цепей АВ1; и где каждый АВ2 связан со вторым маскирующим фрагментом (ММ2), связанным со вторым расщепляемым фрагментом (СМ2), с образованием конструкции ММ2-СМ2, где карбоксильный конец каждой конструкции ММ2-СМ2 связан с аминоконцом каждого АВ2, где

ММ2 ингибирует связывание АВ2 с его мишенью; и

СМ2 представляет собой полипептид, который функционирует в качестве субстрата для второй протеазы,

и причем АВ1 содержит Fc-область, содержащую аминокислотную замену по меньшей мере в одном из аминокислотных положений L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0313] 67. ВАА по варианту осуществления 66, в котором область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в положениях аминокислот L234, L235, N297 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0314] 68. ВАА по варианту осуществления 66, в котором область Fc содержит аминокислотные замены по меньшей мере в положениях аминокислот L234, L235 и P331 (нумерация в соответствии с индексом EU согласно Кабату) таким образом, что ВАА имеет пониженную эффекторную функцию.

[0315] 69. ВАА по любому из вариантов осуществления 66–68, в котором первая мишень выбрана из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9, а вторая мишень выбрана из группы, состоящей из мишеней, представленных в таблице 9.

[0316] 70. АА или ВАА по любому из вышеуказанных вариантов осуществления, в которых их антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, однодоменного антитела, состоящего из тяжелых цепей и однодоменного антитела, состоящего из легких цепей.

[0317] 71. АА или ВАА по любому из вышеуказанных вариантов осуществления, в которых антитело представляет собой антитело грызуна, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое моноклональное антитело.

[0318] 72. АА по любому из вариантов осуществления 32–37 и 51–71, в котором АА представляет собой ВАА.

- [0319] 73. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 и, необязательно, носитель.
- [0320] 74. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 73, содержащая дополнительный агент.
- [0321] 75. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 74, в которой дополнительным агентом является терапевтический агент.
- [0322] 76. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72.
- [0323] 77. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 76.
- [0324] 78. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты pLW289.
- [0325] 79. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты pLW246.
- [0326] 80. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты pLW307.
- [0327] 81. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты pLW291.
- [0328] 82. Клетка, содержащая любой из векторов в соответствии с вариантами осуществления 77–81.
- [0329] 83. Клетка, содержащая pLW289 и pLW246.
- [0330] 84. Клетка, содержащая pLW307 и pLW291.
- [0331] 85. Способ получения антитела, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела, АА или ВАА, в котором клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 76 или вектор по любому из вариантов осуществления 78–81.
- [0332] 86. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования расстройства или заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 73–75 субъекту, нуждающемуся в этом.
- [0333] 87. Способ по п. 86, в котором расстройство или заболевание включает в себя заболевание клеток, экспрессирующих EGFR.
- [0334] 88. Способ по варианту осуществления 86 или 87, в котором расстройство или заболевание представляет собой рак.
- [0335] 89. Способ по варианту осуществления 88, в котором рак представляет собой рак анального канала, базальноклеточный рак, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак кости, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный

рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, глиобластома, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак тонкой кишки, плоскоклеточный рак, рак кожи, рак яичка, рак щитовидной железы или рак матки.

[0336] 90. Способ ингибирования ангиогенеза у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 73–75 субъекту, нуждающемуся в этом.

[0337] 91. Способ по любому из вариантов осуществления 86–90, в котором способ содержит введение дополнительного агента.

[0338] 92. Способ по варианту осуществления 91, в которой дополнительным агентом является терапевтический агент.

[0339] 93. Способ уменьшения повреждения здоровой ткани, вызванного связыванием антитела с его мишенью на здоровой ткани так же, как и на больной ткани, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, АА или ВАА, или фармацевтической композиции, содержащей АА или ВАА, где указанные АА или ВАА представляют собой АА или ВАА по любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[0340] 94. Способ улучшения переносимости лечения антителами, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, АА или ВАА или фармацевтической композиции, содержащей АА или ВАА, где указанные АА или ВАА представляет собой АА или ВАА по любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[0341] 95. Способ рекрутирования Т-клеток в опухолевую ткань, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, АА или ВАА или фармацевтической композиции, содержащей АА или ВАА, где указанные АА или ВАА представляют собой АА или ВАА по любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

[0342] 96. Антитело, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 73–75 для применения в качестве лекарственного средства.

[0343] 97. Антитело, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 73–75 для использования в способе лечения, ослабления симптома или задержки прогрессирования

расстройства или заболевания, где расстройство или заболевание включает в себя заболевание клеток, экспрессирующих EGFR.

[0344] 98. Антитело, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 73–75 для применения в способе лечения рака; причем необязательно рак представляет собой рак анального канала, базальноклеточный рак, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак кости, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак желудка, глиобластому, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, саркому, рак тонкой кишки, плоскоклеточный рак, рак кожи, рак яичка, рак щитовидной железы или рак матки.

[0345] 99. Антитело, АА или ВАА по любому из вариантов осуществления 1–72 или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 73–75 для применения в способе лечения, где способ включает ингибирование ангиогенеза.

[0346] 100. Антитело, АА или ВАА или фармацевтическая композиция для применения по любому из вариантов осуществления 96–99, причем применение включает введение дополнительного агента, при этом необязательно дополнительный агент представляет собой терапевтический агент.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Последовательности, векторная конструкция и экспрессия антител, ВАА и активированных ВАА

Представляющие интерес антитела

[0347] Молекулы, представленные в таблице 11 ниже, были сконструированы и протестированы. Как представлено далее, активированные молекулы были получены в маскированном виде и протеолитически расщеплены для получения активированных форм.

Таблица 11

| Название молекулы | Компоненты молекулы | Вектор тяжелой цепи | Вектор легкой цепи |
|-------------------|--|---------------------|--------------------|
| CI011 | 3954-0001-C225v5N297Q-JF15865-0001-CD3LvHv-H-N | pLW023 | OPP02 2 |
| CI020 | 3954-Nsub-C225v5N297Q-JF15865-Nsub- | pLW073 | pLW07 |

| Название молекулы | Компоненты молекулы | Вектор тяжелой цепи | Вектор легкой цепи |
|----------------------|--|---------------------|--------------------|
| | hSP34LvHv-H-N | | 1 |
| CI040 | 3954-2001-C225v5N297Q-JF15865-2001-hSP34LvHv-H-N | pLW101 | CTX12 2 |
| CI048 | Активированный CI011: 3954-0001-C225v5N297Q-JF15865-0001-CD3LvHv-H-N | pLW023 | OPP02 2 |
| CI079 | 3954-0001-C225v5Fcmt3-h20GG-0001-v16sc-H-N | pLW225 | OPP02 2 |
| CI090 | 3954-0001-C225v5Fcmt4-h20GG-0001-v16sc-H-N | pLW233 | OPP02 2 |
| Активированный CI090 | Активированный 3954-0001-C225v5Fcmt4-h20GG-0001-v16sc-H-N | pLW233 | OPP02 2 |
| Активированный CI104 | Активированный 3954-0011-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N | pLW289 | pLW29 1 |
| CI106 | CF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N | pLW289 | pLW24 6 |
| CI107 | 3954-0011-C225v5Fcmt4-h20GG-2006-v16sc-H-N | pLW307 | pLW29 1 |
| CI127 | SynFcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N | pLW334 | pLW13 9 |
| CI128 | SynFcmt4-h20GG-2006-v16sc-H-N | pLW335 | pLW13 9 |
| CI135 | CF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v12sc-H-N | pLW352 | pLW24 6 |
| CI136 | CF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v19sc-H-N | pLW353 | pLW24 6 |
| CI091 | 3954-1490DQH-C225v5Fcmt4-h20GG-2008-v16sc-H-N | pLW242 | CX320 |
| CI064 | SynN297Q-JF15865-0001-hSP34LvHv-H-N | pLW138 | pLW13 9 |
| v12 | Анти-CD3 вариант | HV12 | LV12 |
| v16 | Анти-CD3 вариант | HV20 | LV12 |

| Название молекулы | Компоненты молекулы | Вектор тяжелой цепи | Вектор легкой цепи |
|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| v19 | Анти-CD3 вариант | HV20 | LV19 |
| v26 | Анти-CD3 вариант | HV12 | LV19 |

[0348] Последовательности молекул и векторов приведены ниже. Скобки обозначают некоторые составные части представленных молекул. В некоторых последовательностях предусмотрены линкеры. Подчеркнутые аминокислоты обозначают предсказанные последовательности CDR.

CI011: 3954-0001-C225v5N297Q-JF15865-0001-CD3LvHv-H-N

pLW023: HC JF15865-0001-CD3LvHv-C225v5N297Q (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 176] [pLW023 без спейсера SEQ ID NO: 177]

CAAGGCCAGTCTGGCCAAATGATGTATTGCGGTGGGAATGAGGTGTTGTGCGGGCC
GCGGGTTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
ATAATCATGGCGGCGGTTCTCAGACCGTGGTCACACAGGAGCCCTCACTGACAGTG
AGCCCTGGCGGGACCGTCACACTGACTTGTTCGAGTTCAACTGGCGCCGTGACTACC
AGCAATTACGCTAACTGGGTCCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCACGAGGACTGAT
CGGAGGAACTAATAAGAGAGCACCAGGAACCCCTGCAAGGTTCTCCGGATCTCTGC
TGGGGGGAAAAGCCGCTCTGACACTGAGCGGCGTGCAGCCTGAGGACGAAGCTGAG
ТАСТАТТGCGCACTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTTGGCGGGGGAACTAAGCTG
ACCGTCCTGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGGAGCGGAGGAGGAGGATCCG
AAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCCCTGAA
GCTGTCTTGTGCAGCCAGTGGCTTCACCTTCAACACTTACGCAATGAACTGGGTGCG
GCAGGCACCTGGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGCCCGGATCAGATCTAAATACAATA
ACTATGCCACCTACTATGCTGACAGTGTGAAGGATAGGTTACCATTTACGCGACG
ATAGCAAAAACACAGCTTATCTGCAGATGAATAACCTGAAGACCGAGGATACAGCA
GTGТАСТАТТGCGTCAGACACGGCAATTTCCGGAACTCTTACGTGAGTTGGTTTGCC
TATTGGGGACAGGGGACACTGGTACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCAGGT
GCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTA
CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGA

GCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGAT
TATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAGATAACAGCAAAAGCCA
GGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGC
GCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGT
GACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
GCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAA (SEQ ID
NO: 105)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW023 без спейсера SEQ ID NO: 179]

QGQSGQ[MMYCGGNEVLCGPRV][GSSGGSGGSGG][LSGRSDNH][GGGS]QTVVTQEPS
LTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL
LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNN
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY
WGQGTLLTVSS[GGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP
GKGLEWLGVWISGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALT
YYDYEFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 106)

OPP022: LC 3954-0001-C225v5

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 180] [OPP022 без спейсера SEQ ID NO: 181]

TCCGATAATCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATT
CTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCAT
TGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGAT
TAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCA
GCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGAT
TATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAAC
GGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID
NO: 107)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [OPP022 без спейсера SEQ ID NO: 182]

[SDNH][GSSGT][QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIK
YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVSEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 108)

CI020: 3954-Nsub-C225v5N297Q-JF15865-Nsub-hSP34LvHv-H-N

pLW073: HC C225v5N297Q-JF15865-Nsub-hSP34LvHv (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 176] [pLW073 без спейсера SEQ ID NO: 183]

СААGGCCAGTCTGGCCAAATGATGTATTGCGGTGGGAATGAGGTGTTGTGCGGGCC
GCGGGTTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTGGTGGAGGCTCGGGCG
GTGGGAGCGGCGGCGGTTCTCAGACCGTGGTCACACAGGAGCCCTCACTGACAGTG
AGCCCTGGCGGGACCGTCACACTGACTTGTGCGCAGTTCAACTGGCGCCGTGACTACC
AGCAATTACGCTAACTGGGTCCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCACGAGGACTGAT
CGGAGGAACTAATAAGAGAGCACCAGGAACCCCTGCAAGGTTCTCCGGATCTCTGC
TGGGGGAAAAGCCGCTCTGACACTGAGCGGCGTGCAGCCTGAGGACGAAGCTGAG
ТАCTATTGCGCACTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTTGGCGGGGAACTAAGCTG
ACCGTCCTGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGGAGCGGAGGAGGAGGATCCG
AAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCCCTGAA
GCTGTCTTGTGCAGCCAGTGGCTTCACCTTCAACACTTACGCAATGAACTGGGTGCG
GCAGGCACCTGGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGCCCGGATCAGATCTAAATAACAATA
ACTATGCCACCTACTATGCTGACAGTGTGAAGGATAGGTTACCATTTACGCGACG
ATAGCAAAAACACAGCTTATCTGCAGATGAATAACCTGAAGACCGAGGATACAGCA
GTGТАCTATTGCGTCAGACACGGCAATTTCCGGAACTCTTACGTGAGTTGGTTTGCC
TATTGGGGACAGGGGACACTGGTCAACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCCAGGT
GCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTА
CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGA
GCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGAT
TATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTААСААAGATAACAGCAAAAGCCA
GGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGC
GCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT
GACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
САAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAАCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
САACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCСААТСТTGTGACAAAАCTCACACAT
GCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCC

CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAA (SEQ ID
NO: 109)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW073 без спейсера SEQ ID NO: 184]

QGQSGQ[MMYCGGNEVLCGPRV][GSSGGSGGSGGGGSGGGSGGGG]QTVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGG]EV
QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA
TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLVTVSS[GGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG
LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYD
YEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 110)

pLW071: LC 3954-Nsub-C225v5

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 180] [pLW071 без спейсера SEQ ID NO: 185]

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTC
ATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGCTCAGGTGGAGGCTCGGG
CGGTGGGAGCGGCGGTTCTGATATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGT
GAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCA
ACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAATATG
CGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC
GATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGC
CAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACCTGGAACCTGAA
ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAA
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 111)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW071 без спейсера SEQ ID NO: 186]

QGQSGQ[CISPRGCPDGPYVMY][GSSGSGSGSGSGSGSGSGSGS]DILLTQSPVILSVS
PGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS
VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 112)

CI040: 3954-2001-C225v5N297Q-JF15865-2001-hSP34LvHv-H-N

pLW101: HC JF15865-2001-CD3LvHv-C225v5N297Q (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 176] [pLW101 без спейсера SEQ ID NO: 187]

CAAGGCCAGTCTGGCCAAATGATGTATTGCGGTGGGAATGAGGTGTTGTGCGGGCC
GCGGGTTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATCTCTTCCGGACTGCT
GTCCGGCAGATCCGACAATCACGGCGGCGGTTCTCAGACCGTGGTCACACAGGAGC
CCTCACTGACAGTGAGCCCTGGCGGGACCGTCACACTGACTTGTCGCAGTTCAACTG
GCGCCGTGACTACCAGCAATTACGCTAACTGGGTCCAGCAGAAACCAGGACAGGCA
CCACGAGGACTGATCGGAGGAACTAATAAGAGAGCACCAGGAACCCCTGCAAGGTT

CTCCGGATCTCTGCTGGGGGAAAAGCCGCTCTGACACTGAGCGGCGTGCAGCCTG
AGGACGAAGCTGAGTACTATTGCGCACTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTTGGCG
GGGGAATAAGCTGACCGTCCTGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGGAGCGG
AGGAGGAGGATCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA
GGAGGATCCCTGAAGCTGTCTTGTGCAGCCAGTGGCTTCACCTTCAACACTTACGCA
ATGAACTGGGTGCGGCAGGCACCTGGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGCCCGGATCAG
ATCTAAATAACAATAACTATGCCACCTACTATGCTGACAGTGTGAAGGATAGGTTCAC
CATTTACGCGACGATAGCAAAAACACAGCTTATCTGCAGATGAATAACCTGAAGA
CCGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGTCAGACACGGCAATTTCCGGAACTCTTACG
TGAGTTGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTG
GTGGATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAG
AGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCA
TGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGG
CGGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATA
ACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATAACCGCG
ATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCC
AGGGCACCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA
TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
TCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACC
AGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
A (SEQ ID NO: 113)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW101 без спейсера SEQ ID NO: 188]

QGQSGQ[MMYCGGNEVLCGPRV][GSSGGSGGSGG][ISSGLLSGRSDNH][GGGS]QTVVT
QEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARF
SGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSG
GGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS
WFAYWGQGTLVTVSS[GGGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWV
RQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCA
RALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 114)

CTX122: LC 3954-2001-C225v5

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 180] [CTX122 без спейсера SEQ ID NO: 189]

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTC
ATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTATTAGCAGTGG
TCTGTTAAGCGGTCGTAGCGATAATCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGAC
CCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCC
GCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGC
AGCCCGCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCG
CTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAA
GCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTG
GCGCGGGCACCAAACTGGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT
TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG

CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
GGAGAGTGT (SEQ ID NO: 115)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [CTX122 без спейсера SEQ ID NO: 190]

QGQSGQ[CISPRGCPDGPYVMY][GSSGGSGGSGGSG][ISSGLLSGRSDNH][GSSGT]QILL
TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS
GTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLTKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 116)

CI048: Активированный CI011: 3954-0001-C225v5N297Q-JF15865-0001-CD3LvHv-H-N

Последовательности pLW023 и OPP022, кодирующие соответствующие маскированные компоненты антитела, представлены здесь как «pLW023» и «OPP022» соответственно, и кратко характеризованы в таблице 11.

Активированный pLW023: HC JF15865-0001-CD3LvHv-C225v5N297Q (H-N)

Нуклеотидная

последовательность TCCGATAATCATGGCGGCGGTTCTCAGACCGTGGTCACACAGGA
GCCCTCACTGACAGTGAGCCCTGGCGGGACCGTCACACTGACTTGTCGCAGTTCAAC
TGGCGCCGTGACTACCAGCAATTACGCTAACTGGGTCCAGCAGAAACCAGGACAGG
CACCACGAGGACTGATCGGAGGAACTAATAAGAGAGCACCAGGAACCCCTGCAAG
GTTCTCCGGATCTCTGCTGGGGGAAAAGCCGCTCTGACACTGAGCGGCGTGCAGC
CTGAGGACGAAGCTGAGTACTATTGCGCACTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTTG
GCGGGGGAACCTAAGCTGACCGTCCTGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGGAG
CGGAGGAGGAGGATCCGAAGTGCAGCTGGTTCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG
CCAGGAGGATCCCTGAAGCTGTCTTGTGCAGCCAGTGGCTTCACCTTCAACACTTAC
GCAATGAACTGGGTGCGGCAGGCACCTGGGAAGGGACTGGAATGGGTTCGCCC GGAT
CAGATCTAAATACAATAACTATGCCACCTACTATGCTGACAGTGTGAAGGATAGGTT
CACCATTTACGCGACGATAGCAAAAACACAGCTTATCTGCAGATGAATAACCTGA
AGACCGAGGATACAGCAGTGTACTATTGCGTCAGACACGGCAATTTCCGGAACTCT
TACGTGAGTTGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGGACACTGGTCCCGTCTCCTCAGGA
GGTGGTGGATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAG

CCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGT
GCATTGGGTGCGCCAGAGCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGA
GCGGCGGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAA
GATAACAGCAAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATAC
CGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGG
GGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA
GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC
GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT
CAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT
GCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAG (SEQ ID NO: 117)

Аминокислотная последовательность

[SDNH][GGGS]QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRG
LIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKL
TVL[GGGGSGGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVR
QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV
YYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS[GGGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITC
TVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLVGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK
MNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP

EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 118)

Активированный OPP022: LC 3954-0001-C225v5

Нуклеотидная

последовательность TCCGATAATCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCA
GAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCG
CGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGC
CCGCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTT
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGCGA
AGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACACTGGCCGACCACCTTTGGCGC
GGGCACCAAACTGGAACACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAA
CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG
GTAACCTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG
CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGT (SEQ ID NO: 119)

Аминокислотная последовательность

[SDNH][GSSGT]QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIK
YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 120)

CI079: 3954-0001-C225v5Fcmt3-h20GG-0001-v16sc-H-N

pLW225: HC h20GG-0001-v16sc-C225v5Fcmt3 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191]_[pLW225 без спейсера SEQ ID NO: 192]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
CACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
ATAATCATGGCGGCGGTTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCCGTCT
CCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACC
AGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATTGAT
AGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGCATAAC
TCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGTGATT
ATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAACTTA
CTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCAGAA
GTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCAAACCT
CTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGGTCCGGCA
GGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAATACAACAACCT
ACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGACGATA
GCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAACCTGAGGATACCGCTGTGT
ATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTG
GGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGC
TGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGC
ACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATA
ACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTG
TTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGC
GCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACC
GTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA
ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG
ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAATAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT

GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:
121)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178]_[pLW225 без спейсера SEQ ID NO: 193]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][LSGRSDNH][GGGS]QTVVTQEPSF
SVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSIL
GNKAALTITGAQADDES DYICALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS[GGGS]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTY
DYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID
NO: 122)

OPP022: LC 3954-0001-C225v5

Последовательности, указанные выше

CI090: 3954-0001-C225v5Fcmt4-h20GG-0001-v16sc-H-N

pLW233: HC h20GG-0001-v16sc-C225v5Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191]_[pLW233 без спейсера SEQ ID NO: 194]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
CACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
ATAATCATGGCGGCGGTTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCCGTCT
CCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACC
AGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATTGAT
AGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGCATAAC
TCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGTGATT
ATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAACTTA
CTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCAGAA
GTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCAAACCT
CTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGGTCCGGCA
GGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAATACAACAACCT
ACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGACGATA
GCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAACCTGAGGATACCGCTGTGT
ATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTG
GGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGC
TGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGC
ACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATA
ACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTG
TTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGC
GCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACC
GTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA
ACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG
ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCTCACCCTGACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT

GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:
123)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178]_[pLW233 без спейсера SEQ ID NO: 195]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][LSGRSDNH][GGGS]QTVVTQEPSF
SVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSIL
GNKAALTITGAQADDES DYICALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS[GGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTY
DYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 124)

OPP022: LC 3954-0001-C225v5

Последовательности, указанные выше

Активированный CI090: Активированный 3954-0001-C225v5Fcmt4-h20GG--0001-v16sc-H-
N

Активированный pLW233: HC C225v5Fcmt4-h20GG-0001-v16sc (H-N)

Последовательность нуклеиновой кислоты

TCCGATAATCATGGCGGCGGTTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCC
GTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACG

ACCAGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATT
GATAGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGC
ATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGT
GATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAAA
CTTACTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTC
AGAAGTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCA
AACTCTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGGTCC
GGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAATACAA
CAACTACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGA
CGATAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAACTGAGGATACCGC
TGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAACTCATATGTCTCTTGGTTTCGCT
TATTGGGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGT
GCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATT
CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGA
GCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGAT
TATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCA
GGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGC
GCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGT
GACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
GCCACCGTGCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC

TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 164)

Аминокислотная последовательность

[SDNH]GGGSQTVVVTQEPSFSVSPGGTVLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLI
GGTNKRAPGVPDFRSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKLTV
LGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAS
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYC
TRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSG
FSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVWSSGGNTDYNTPFTRSLSINKDNSKSQVFFKMNS
LQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 165)

Активированный OPP022: 3954-0001-C225v5

Последовательность нуклеиновой кислоты

TCCGATAATCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATT
CTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCAT
TGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGAT
TAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCA
GCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGAT
TATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAAC
GGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID
NO: 166)

Аминокислотная последовательность

[SDNH]GSSGTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNTNGSPRLLIKYAS
ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 167)

CI104: 3954-0011-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N

Последовательности pLW289 и pLW291, кодирующие соответствующие маскированные компоненты антитела, представлены здесь как «pLW289» и «pLW291» соответственно, и кратко характеризованы в таблице 11.

Активированный CI104: 3954-0011-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N

Активированный pLW289: HC h20GG-0011-v16sc-C225v5Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

TCCGATGATCATGGCGGCGGTTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCC
GTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACG
ACCAGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATT
GATAGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGC
ATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGT
GATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAAA
CTTACTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTC
AGAAGTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCA
AACTCTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGGTCC
GGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAATACAA
CAACTACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGA
CGATAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAAACCTGAGGATAACCGC
TGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCT
TATTGGGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGT
GCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTA
CCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGA
GCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGAT
TATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAGATAACAGCAAAAGCCA

GGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGC
GCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT
GACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC
TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
GCCACCGTGCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTAC
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCA
AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID
NO: 125)

Аминокислотная последовательность

[SDDH][GGGS]QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRG
LIGGTNKRAPGVPDFRSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKL
TVL][GGGGSGGGSGGGGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVR
QASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV
YYCTRHGNGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS[GGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITC
TVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTRSLSINKDNSKSQVFFK
MNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY

PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 126)

Активированный pLW291: LC 3954-0011-C225v5

Нуклеотидная последовательность

TCCGATGATCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGATT
CTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCAT
TGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGAT
TAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCA
GCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGAT
TATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACCT
GGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID
NO: 127)

Аминокислотная последовательность

[SDDH][GSSGT]QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKY
ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVSEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 128)

CI106: CF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N

pLW289: HC h20GG-0011-v16sc-C225v5Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191] [pLW289 без спейсера SEQ ID NO: 196]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
CACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
ATGATCATGGCGGCGGTTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCCGTCT

CCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACC
AGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATTGAT
AGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGCATAAC
TCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGTGATT
ATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAACTTA
CTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCAGAA
GTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCAAAC
CTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGGTCCGGCA
GGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAATACAACAAC
ACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGACGATA
GCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAACTGAGGATACCGCTGTGT
ATTACTGCACAAGACATGGTAATTTGGAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTG
GGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGC
TGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGC
ACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCC
GGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATA
ACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTG
TTTTTTAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGC
GCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACC
GTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA
ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG
ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGT
GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT
GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA
TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCT
CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG

AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA (SEQ ID NO: 129)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW289 без спейсера SEQ ID NO: 197]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][LSGRSDDH][GGGS]QTVVVTQEPSF
SVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSIL
GNKAALTITGAQADDES DYICALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]E
VQLVESGGGLVQP GGS LKLS CAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR HGNFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS[GGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTY
DYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVS VLVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 130)

pLW246: LC CF41-2008-C225v5

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 176] [pLW246 без спейсера SEQ ID NO: 198]

CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCGATGAATAGAGAACA
ATGTTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGTCCGG
CAGATCCGACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTCCTGTCAT
ACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGTCTAT
TGGGACTAACA TACACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCC GCGCCTGCTGA
TTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGC
AGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATT AACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGA
TTATTATTGCCAGCAGAACAACA ACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAA ACT
GGA ACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG

AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID
NO: 131)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW246 без спейсера SEQ ID NO: 199]

QGQSGQG[LSCEGWAMNREQCRA][GGGSSGGS][ISSGLLSGRSDQH][GGGS]QILLTQSP
VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDF
TLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 132)

CI107: 3954-0011-C225v5Fcmt4-h20GG-2006-v16sc-H-N

pLW307: HC h20GG-2006-v16sc-C225v5Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191] [pLW307 без спейсера SEQ ID NO: 200]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
CACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATATCGAGTGGATTGCT
GTCTGGCAGATCTGACGATCACGGCGGCGGTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAAC
CAAGCTTCTCCGTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAG
GTGCTGTTACGACCAGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGCTC
CGCGCGGATTGATAGGAGGCACGAATAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTC
AGCGGAAGCATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGA
TGATGAAAGTGATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGG
TGGCACGAAACTTACTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAG
GAGGAGGCTCAGAAGTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGT
GGTCCCTCAAACCTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATG
AATTGGGTCCGGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATC
AAAATACAACAACCTACGCTACTTATTACGCTGATTCGTTGAAGGACAGATTCACAAT
ATCCCGCGACGATAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAAACCTGA
GGATACCGCTGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAACCTCATATGTCTC
TTGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGG

ATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCC
TGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGG
TGCGCCAGAGCCCAGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGGCGG
AACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAACAAAGATAACAG
CAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTT
ATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGG
GCACCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
(SEQ ID NO: 133)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW307 без спейсера SEQ ID NO: 201]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][ISSGLLSGRSDDH][GGGS]QTVVT
QEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRF
SGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGG
GGG]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSW
FAYWGQGLVTVSS[GGGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR
QSPGKGLEWLGVWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCAR

ALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
(SEQ ID NO: 134)

pLW291: LC 3954-0011-C225v5

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 180] [pLW291 без спейсера SEQ ID NO: 202]

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCATACGTC
ATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTCTGAGCGGCCG
TTCCGATGATCATGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTGAT
TCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCCGCGCGAGCCAGAGCA
TTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGA
TTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGC
AGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGA
TTATTATTGCCAGCAGAACAACAACACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAAC
GGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID
NO: 135)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW291 без спейсера SEQ ID NO: 203]

QGQSGQ[CISPRGCPDGPYVMY][GSSGGSGGSGGSG][LSGRSDDH][GSSGT]QILLTQSP
VILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF
TLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR TVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKH
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 136)

CI127: SynFcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N

pLW334: HC h20GG-0011-v16sc-Synagis[®]Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191] [pLW334 без спейсера SEQ ID NO: 204]

СААGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAAATTGCGGAGGGAT
САСТАСАGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
АТGАТСАТGGCGGCGGTTCTCAAАСТGТАGТААСТСААGААССАAGCTTCTCCGTCT
ССССТGGGGGAACAGTCAСACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACC
AGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATTGAT
AGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGCАТАС
TCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGTGATT
ATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAAACTTA
CTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCAGAA
GTCCAACTGGTСGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCAAАСТ
CTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACАТАСGCGATGAATTGGGTCCGGCA
GGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAАТАСААСAACT
ACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGACGATA
GCAAGAATACGGCАТАТCTTCAGATGAATTCTCTTAAАACTGAGGATACCGCTGTGT
ATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAАACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTG
GGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAAGTGACCC
TGAGAGAGTCTGGCCCTGCCCTCGTGAAGCCTACCCAGACCCTGACACTGACCTGCA
CCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGTCTGTGGGGCTGGATCAGACAGC
CTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGAAGGAC
TACAАСССCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAAGAАССА
GGTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTACTGCG
CCAGATCCATGATCACCАACTGGTACTTCGACGTGTGGGGAGCCGGCACCCACCGTG
ACAGTGTCATCTGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC
AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC
CGAACC GG TGACGGTGTCTGGAАCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAАATCTTGTGACAAAАCTCACACATG

CCCACCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG
TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACC
GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAA
AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG
AGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG (SEQ ID NO:
137)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW334 без спейсера SEQ ID NO: 205]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][LSGRSDDH][GGGS]QTVVTQEPSF
SVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSIL
GNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS[GGGS]QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGVIRQPPG
KALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSM
ITNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 138)

pLW139: LC Synagis®

Нуклеотидная последовательность

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCACACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGT
GACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAGCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGA
AGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGC
GTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACAATCAGC
AGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCC
TTCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACGGTGGCTGCACCATC
TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA
CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 139)

Аминокислотная

последовательностьDIQMTQSPSTLSASVGDRVITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKL
LIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQSGYPFTFGGGTKLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 140)

CI128: SynFcmt4-h20GG-2006-v16sc-H-N

pLW335: HC h20GG-2006-v16sc-Synagis®Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191] [pLW335 без спейсера SEQ ID NO: 206]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
САСТАCAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATATCGAGTGGATTGCT
GTCTGGCAGATCTGACGATCACGGCGGCGGTTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAAC
САAGCTTCTCCGTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAG
GTGCTGTTACGACCAGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGCTC
CGCGCGGATTGATAGGAGGCACGAATAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTC
AGCGGAAGCATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCAAGCTGA
TGATGAAAGTGATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGG
TGGCACGAAACTTACTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAG

GAGGAGGCTCAGAAGTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGT
GGGTCCCTCAAACCTCTTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATG
AATTGGGTCCGGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATC
AAAATACAACAACCTACGCTACTTATTACGCTGATTCCTGAAGGACAGATTCACAAT
ATCCCGCGACGATAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAAACCTGA
GGATACCGCTGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAAACTCATATGTCTC
TTGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGG
ATCCCAAGTGACCCTGAGAGAGTCTGGCCCTGCCCTCGTGAAGCCTACCCAGACCCT
GACACTGACCTGCACCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGTCTGTGGG
CTGGATCAGACAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCGACATTTGGTGGG
ACGACAAGAAGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGAC
ACCAGCAAGAACCAGGTGGTGTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGC
CACCTACTACTGCGCCAGATCCATGATCACCAACTGGTACTTCGACGTGTGGGGAGC
CGGCACCACCGTGACAGTGTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCA
GAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAAAA
CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCT
ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
(SEQ ID NO: 141)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW335 без спейсера SEQ ID NO: 207]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][ISSGLLSGRSDDH][GGGS]QTVVT
QEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRF
SGSILGNKAALTITGAQADDES DYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGG
GGS]EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSK
YNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSW
FAYWGQGLVTVSS[GGGG]QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWI
RQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYY
CARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 142)

pLW139: LC Synagis®

Последовательности, указанные выше

CI135: CF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v12sc-H-N

pLW352: HC h20GG-0011-v12sc-C225v5Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 208] [pLW352 без спейсера SEQ ID NO: 209]

CAAGGCCAGTCTGGTTCTGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGGATC
ACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGA
TGATCATGGCGGCGGATCCCAGACGGTAGTGA CT CAGGAGCCATCATTTTCTGTCTC
TCCTGGAGGTA CT GTGACACTCACATGTAGAAGCTCAACTGGTGCAGTCACCACTTC
AAATTACGCGAATTGGGTCCAGCAGACCCCTGGGCAGGCTCCGAGAGGGTTGATTG
GAGGTA CT AAACAACGGGCACCGGGAGTGCTGATAGGTTTTCCGGTTCTATTCTCG
GAAACAAGGCGGCTCTCACGATCACGGGTGCGCAGGCCGACGATGAATCAGACTAT
TACTGCGCTTTGTGGTACTCAAACCTGTGGGTATTCGGAGGGGGCACCAGCTGACG
GTGTTGGGTGGGGGGGGCTCTGGGGGAGGGGGAAGCGGAGGTGGGGGCAGCGAGG
TTCAGCTTGTTGAAAGTGGTGGCGGACTCGTACAACCGGGTGAAGTCTTAGACTCT
CATGTGCAGCATCTGGATTTACTTTTTCTACTTATGCTATGAACTGGGTAAGACAGG

CACCGGGGAAAGGGCTGGAATGGGTTGCACGCATTCGATCTAAATACAATAACTAT
GCTACATACTACGCCGATAGTGTTAAGGATCGATTCACTATATCTCGGGACGACAGT
AAGAACTCACTTTACCTGCAGATGAATTCCTTGAAAAGTGGAGACACGGCCGTTTAT
TATTGTGTACGGCACGGGAATTTCCGGCAATTCTTACGTTTCCTGGTTCGCCTATTGGG
GGCAAGGTACGCTGGTCACGGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGCTG
AAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCAC
CGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCGG
GCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAAC
ACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAGATAACAGCAAAAAGCCAGGTGTT
TTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGC
GCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT
GAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG
CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG
CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAGTCAACACATGCCACC
GTGCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC
AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAAGTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAA (SEQ ID NO: 151)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 176] [pLW352 без спейсера SEQ ID NO: 210]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][LSGRSDDH][GGGS]QTVVVTQEPSF
SVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSIL
GNKAALTITGAQADDES DYICALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGSGGGGS]E

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS[GGGGS]QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTY
DYEFAFWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIETI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID
NO: 146)

pLW246: LC CF41-2008-C225v5

Нуклеотидная последовательность

Последовательности, указанные выше

Аминокислотная последовательность

Последовательности, указанные выше

CI136: CF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v19sc-H-N

pLW353: HC h20GG-0011-v19sc-C225v5Fcmt4 (H-N)

Нуклеотидная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 191] [pLW353 без спейсера SEQ ID NO: 211]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
CACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
ATGATCATGGCGGCGGTTCTCAGGCCGTTGTTACACAAGAGCCTTCACTTACTGTGT
CTCCAGGAGGCACTGTGACACTTACGTGCCGATCCTCTACGGGTGCCGTGACCACAA
GCAACTATGCCAACTGGGTCCAGCAGAAGCCAGGTCAAGCGCCTCGAGGTCTGATC
GGGGGCACGAATAAACGAGCTCCTGGAACCTCCGGCCAGATTTTCTGGGAGTCTTATT
GGTGGCAAGGCGGCGTTGACCCTGAGTGGAGCCCAACCGGAAGACGAGGCCGAGT
ACTACTGCGCCTTGTGGTATTCCAATTTGTGGGTCTTCGGAGGCGGAACAAAGCTCA
CAGTACTGGGAGGTGGAGGTAGCGGGGGCGGAGGCTCCGGGGGAGGTGGTTCCGA

AGTCCAGCTTGTTGAATCAGGTGGGGGCTTGGTACAACCAGGTGGTTCCTGAAGTT
GTCCTGTGCAGCGTCCGGATTTACATTTAGTACGTATGCTATGAACTGGGTCAGGCA
GGCCAGTGGTAAAGGTCTCGAATGGGTTGGCCGGATAAGGTCAAAGTACAATAATT
ACGCAACCTACTACGCGGATTCCGTGAAAGACAGGTTCACTATTTACAGAGATGATA
GCAAAAATACTGCGTATCTCCAAATGAATAGTCTTAAACTGAAGACACTGCCGTAT
ATTATTGCACTAGGCACGGCAACTTTGGTAACTCTTATGTTTCTTGGTTCGCATACTG
GGGACAAGGAACTTTGGTCACTGTCTCATCTGGAGGTGGTGGATCCCAGGTGCAGCT
GAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCA
CCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCG
GGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAA
CACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGT
TTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCG
CGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCG
TGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGA
GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC
GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA
CCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAA
CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTG
GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATG
ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ ID NO: 152)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW353 без спейсера SEQ ID NO: 212]

QQQSGS[GYLWGCEWNCGGITT][GSSGGSGGSGG][LSGRSDDH][GGGS]QAVVTQEPSL
TVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLI
GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL[GGGGSGGGGSGGGGS]E
VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNY
ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYW
GQGTLVTVSS[GGGG]QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK
GLEWLGVIWWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTY
DYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO: 148)

pLW246: LC CF41-2008-C225v5

Последовательности, указанные выше

CI091: 3954-1490DQH-C225v5Fcmt4-h20GG-2008-v16sc-H-N

pLW242: HC C225v5Fcmt4-h20GG-2008-v16sc (H-N)

Последовательность нуклеиновой кислоты

[спейсер SEQ ID NO: 191] [pLW242 без спейсера SEQ ID NO: 213]

CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGAATTGCGGAGGGAT
CACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTATATCGAGTGGATTGCT
GTCTGGCAGATCTGACCAACACGGCGGCGGTCTCAAACCTGTAGTAACTCAAGAAC
CAAGCTTCTCCGTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAG
GTGCTGTTACGACCAGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGCTC
CGCGCGGATTGATAGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTC
AGCGGAAGCATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGA
TGATGAAAGTGATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGG
TGGCACGAAACTTACTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAG
GAGGAGGCTCAGAAGTCCAACCTGGTTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGT
GGGTCCCTCAAACCTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATG
AATTGGGTCCGGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATC

AAAATACAACAACACTACGCTACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAAT
ATCCCGCGACGATAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAACTGA
GGATACCGCTGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTGGAACATCATATGTCTC
TTGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGG
ATCCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCC
TGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGG
TGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGC
AACACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAG
CAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATACC GCGATTT
ATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGG
GCACCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCAATCGAGAAAACC
ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
(SEQ ID NO: 168)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW242 без спейсера SEQ ID NO: 214]

QGQSGS[GYLWGCEWNCGGITT]GSSGSGSGSGG[ISSGLLSGRSDQH]GGGSQTVVTQE
PSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSG
SILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGG

SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNN
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAY
WGQGTLVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPG
KGLEWLGVIVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTY
YDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 169)

CX320: 3954-C225v5-2008

Последовательность нуклеиновой кислоты

[спейсер SEQ ID NO: 180] [CX320 без спейсера SEQ ID NO: 215]

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCATACGTC
ATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTATATCGAGTGG
ATTGCTGTCTGGCAGATCTGACCAACACGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGAC
CCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGCTGCC
GCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGC
AGCCCGCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCG
CTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAA
GCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTG
GCGCGGGCACCAAACTGGAACGTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT
TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG
GGAGAGTGT (SEQ ID NO: 170)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [CX320 без спейсера SEQ ID NO: 216]

QQQSGQ[CISPRGCPDGPYVMY]GSSGGSGGSGGSG[ISSGLLSGRSDQH]GSSGTQILLTQ
SPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGT
DFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNFPYAPREKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 171)

CI064: SynN297Q-JF15865-0001-hSP34LvHv-H-N

pLW138: HC SynN297Q-JF15865-0001-hSP34LvHv-H-N

Последовательность нуклеиновой кислоты

[спейсер SEQ ID NO: 176] [pLW138 без спейсера SEQ ID NO: 147]

CAAGGCCAGTCTGGCCAAATGATGTATTGCGGTGGAATGAGGTGTTGTGCGGGCC
GCGGGTTGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCG
ATAATCATGGCGGCGGTTCTCAGACCGTGGTCACACAGGAGCCCTCACTGACAGTG
AGCCCTGGCGGGACCGTCACACTGACTTGTTCGAGTTCAACTGGCGCCGTGACTACC
AGCAATTACGCTAACTGGGTCCAGCAGAAACCAGGACAGGCACCACGAGGACTGAT
CGGAGGAACTAATAAGAGAGCACCAGGAACCCCTGCAAGGTCTCCGGATCTCTGC
TGGGGGAAAGCCGCTCTGACACTGAGCGGCGTGCAGCCTGAGGACGAAGCTGAG
TACTATTGCGCACTGTGGTACTCCAACCTGTGGGTGTTTGGCGGGGAACTAAGCTG
ACCGTCCTGGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGGAGCGGAGGAGGAGGATCCG
AAGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCCCTGAA
GCTGTCTTGTGCAGCCAGTGGCTTCACCTTCAACACTTACGCAATGAACTGGGTGCG
GCAGGCACCTGGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGCCCGGATCAGATCTAAATAACAATA
ACTATGCCACCTACTATGCTGACAGTGTGAAGGATAGGTTACCATTTACGCGACG
ATAGCAAAAACACAGCTTATCTGCAGATGAATAACCTGAAGACCGAGGATACAGCA
GTGTACTATTGCGTCAGACACGGCAATTTCCGGAACTCTTACGTGAGTTGGTTTGCC
TATTGGGGACAGGGGACACTGGTCACCGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGATCCCAAGT
GACCCTGAGAGAGTCTGGCCCTGCCCTCGTGAAGCCTACCCAGACCCTGACACTGAC
CTGCACCTTCAGCGGCTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGTCTGTGGGCTGGATCAG
ACAGCCTCCTGGCAAGGCCCTGGAATGGCTGGCCGACATTTGGTGGGACGACAAGA
AGGACTACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGACACCAGCAAG
AACCAGGTGGTGCTGAAAGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTA
CTGCGCCAGATCCATGATCACCACCTGGTACTTCGACGTGTGGGGAGCCGGCACCA
CCGTGACAGTGTGATCTGCTAGCACCAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT
CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC

TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGTGCA
CACCTTCCC GGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC
CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACA
CATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
CCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCAGC
TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAG
ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA (SEQ
ID NO: 172)

Аминокислотная последовательность

[спейсер SEQ ID NO: 178] [pLW138 без спейсера SEQ ID NO: 153]

QGQSGQ[MMYCGGNEVLCGPRV]GSSGSGSGSGG[LSGRSDNH]GGGSQTVVVTQEPSLT
VSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG
GKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQ
LVESGGGLVQPGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG
QGTLVTVSSGGGGSQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSTSGMSVGVWIRQPPGKA
LEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMIT
NWFYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID
NO: 173)

pLW139: LC Syn kappa

Последовательность нуклеиновой кислоты

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCACACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGT
GACCATCACATGCAAGTGCCAGCTGAGCGTGGGCTACATGCACTGGTATCAGCAGA
AGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCCGGC
GTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGAGTTCACCCTGACAATCAGC
AGCCTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGTTTTCAAGGCTCCGGCTACCCC
TTCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACGGTGGCTGCACCATC
TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA
CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 174)

Аминокислотная последовательность

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKCQLSVGYMHWYQQKPKAPKLLIYDTSKLASGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCFQGSQYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 175)

Анти-CD3 вариант scFv v 12

Легкая цепь LV12

Тяжелая цепь HV12

Последовательности, указанные выше

Анти-CD3 вариант scFv v 16

Легкая цепь LV12

Тяжелая цепь HV20

Последовательности, указанные выше

Анти-CD3 вариант scFv v 19

Легкая цепь LV19

Тяжелая цепь HV20

Последовательности, указанные выше

Анти-CD3 вариант scFv V26

Легкая цепь LV19

Тяжелая цепь HV12

Последовательности, указанные выше

Конструкция вектора

[0349] Тяжелые и легкие цепи отдельно клонировали в вектор экспрессии млекопитающих с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Вкратце, фрагменты ДНК, кодирующие представляющую интерес область, амплифицировали праймерами, связывающимися с концевыми областями. Перекрывающиеся фрагменты объединяли и амплифицировали фланкирующими праймерами, необходимыми для построения всей желаемой области. Впоследствии фрагменты ДНК клонировали в вектор экспрессии с использованием коммерчески доступного набора для гомологичной рекомбинации (MCLabs, South San Francisco, Калифорния). Вектор экспрессии млекопитающих представляет собой модифицированную версию кДНКTM3.1 (+) от Invitrogen с маркером селекции G418 или гигромицином. Мутации были введены с использованием набора QuikChange (Agilent, Santa Clara, Калифорния).

Экспрессия АА и ВАА с двойной маскировкой (ВАА)

[0350] АА и ВАА были экспрессированы в клетках млекопитающих с использованием стандартного набора для трансфекции (Life Technologies, Grand Island, NY). Вкратце, 293 клетки были трансфицированы нуклеиновыми кислотами с использованием системы на основе липидов в соответствии с рекомендациями производителя. АА и дважды маскированные ВАА были очищены от бесклеточного супернатанта с использованием сфер белка А (GE, Piscataway, NJ) и сконцентрированы с использованием стандартных колонок с заменой буфера (Millipore, Temecula, CA).

ПРИМЕР 2. Связывание дважды маскированных биспецифических АА с EGFR+ HT-29 клетками и CD3ε+ клетками Jurkat

[0351] Для определения того, способны ли EGFR и CD3ε маскирующие пептиды и субстраты протеаз ингибировать связывание в контексте биспецифического АА с двойной маскировкой, был выполнен анализ связывания посредством проточной цитометрии.

[0352] Клетки HT-29-luc2 (Caliper) и Jurkat (клон Е6-1, АТСС, ТІВ-152) культивировали в RPMI-1640+ glutamax (Life Technologies, каталог 72400-047), 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотке (HI-FBS, Life Technologies, каталог 10438-026), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, каталог 15140-122) в соответствии с рекомендациями производителя. Были протестированы следующие биспецифические активированные антитела CI048 и CI104 (акт-104), а также биспецифические AA CI011, CI106 и CI107 с двойной. Использовались две версии SP34 scFv, а именно scFv CI011 и CI048 в сравнении с scFv CI104, CI106 и CI107. Использовались две версии маски EGFR, а именно маска EGFR CI011 и CI107 в сравнении с маской EGFR CI106. Использовались две версии маски CD3, а именно маска CD3 CI011 в сравнении с маской CD3 CI106 и CI107.

[0353] Клетки HT29-luc2 отделяли с помощью Versene™ (Life Technologies, Catalogue 15040-066), промывали, высевали в 96-луночные планшеты по 150 000 клеток/луночку и ресуспендировали в 50 мкл первичного антитела. Титрование начинали при концентрациях, указанных на фиг. 1А–1В с последующими 3-кратными серийными разведениями в FACS-окрашивающем буфере + 2% ФБС (BD Pharmingen, Catalogue 554656). Клетки инкубировали при 4 °С при встряхивании в течение примерно 1 часа, собирали и промывали 2×200 мкл окрашивающего буфера FACS. Клетки ресуспендировали в 50 мкл конъюгированного с Alexa Fluor 647 анти-человеческого IgG Fc (10 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch, продукт 109-606-008) и инкубировали при 4 °С при встряхивании в течение примерно 1 часа. HT29-luc2 собирали, промывали и ресуспендировали в конечном объеме 60 мкл окрашивающего буфера FACS, содержащего 2,5 мкг/мл 7-AAD (BD Biosciences, каталог 559925). Клетки, окрашенные одним вторичным антителом, использовали в качестве отрицательного контроля. Данные были получены на анализаторе MACSQuant® 10 (Miltenyi), а среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) жизнеспособных клеток рассчитывали с использованием FlowJo® V10 (Treestar). Вычтенные фоновые данные MFI были построены в GraphPad Prism 6 с использованием анализа подгонки кривой.

[0354] Растущие в суспензии клетки Jurkat собирали, промывали, высевали в 96-луночные планшеты по 150 000 клеток/луночку и ресуспендировали в 50 мкл первичного антитела. Окрашивание и сбор данных осуществляли аналогично описанному выше для клеток HT29-luc2.

[0355] На фиг. 1А показано, что включение маскирующего пептида CD3 h20GGε в EGFR маскировало значительно сниженное связывание CI106 и CI107 ВАА с клетками Jurkat по сравнению с CI011. В некоторых вариантах осуществления было обнаружено

более чем 5000-кратное снижение связывания с клетками Jurkat. В некоторых вариантах осуществления scFv по изобретению также приводит к уменьшению связывания. Также очевидным является снижение связывания с клетками HT29-luc2 EGFR+ у С1106 и С1107 относительно С1011 (фиг. 1В). В некоторых вариантах осуществления было обнаружено более чем 1 000-кратное снижение связывания с клетками EGFR+ HT29-luc2. На фиг. 1А и фиг. 1В ВАА с двойной маскировкой проявляют пониженное связывание по сравнению с активированными биспецифическими антителами.

ПРИМЕР 3. EGFR-зависимая цитотоксичность ВАА с двойной маскировкой

[0356] Для определения того, способны ли маски CD3ε и EGFR и субстраты протеаз С1106 и С1107 дополнительно ослаблять гибель клеток по сравнению с С1011 и С1040, был проведен анализ цитотоксичности. МКПК человека закупают в замороженных аликвотах (NemaCare) и культивировали совместно с экспрессирующими EGFR клетками HT29-luc2, в соотношении 10:1 в RPMI-1640 + глутамакс с добавлением 5% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки (Sigma, Catalogue H3667). Были протестированы титрования следующих биспецифических активированных антител и ВАА с двойной маскировкой: С1011, С1040, активированных С1104, С1106 и С1107. Кроме того, не связанные с EGFR маскированные биспецифические АА С1127 и С1128 были использованы для демонстрации EGFR-зависимости цитотоксичности. Через 48 часов цитотоксичность оценивали с использованием системы анализа люциферазы ONE-Glo™ (Promega, Catalogue E6130). Люминесценцию измеряли с использованием Infinite M200 Pro (Tecan). Процент цитотоксичности рассчитывали и наносили на график в GraphPad PRISM с анализом подгонки кривой. Количество рецепторов EGFR на панели клеточных линий определяли количественно с помощью проточной цитометрии с использованием QIFIKIT (Dako).

[0357] На фиг. 2А показано, что гибель клеток HT29-luc2 EGFR+ и была дополнительно ослаблена у С1106 и С1106 по сравнению с С1011 и С1040. На фиг. 2В показано, что цитотоксичность не наблюдалась при обработке клеток С1127 и С1128, что демонстрирует зависимость нацеливания EGFR для уничтожения клеток. Кроме того на фиг. 2В показано более чем 300 000-кратное смещение EC50 биспецифических антител С1106 и С1107 с двойной маскировкой относительно активированного протеазой биспецифического антитела act-104. На фиг. 2С изображено количество рецепторов EGFR на панели клеточных линий, которая включает HT29. Приблизительное число рецепторов EGFR на клетках HT29 составляло 75 000, что указывает на отсутствие необходимости в высокой плотности антигена для сильной цитотоксичности тестируемых антител.

ПРИМЕР 4. Первичная активация Т-клеток ВАА с двойной маскировкой

[0358] Для определения того, способны ли маски CD3ε и EGFR C1106 и C1107 ослаблять первичную активацию Т-клеток относительно C1011 и C1040, был проведен анализ способом проточной цитометрии. Клетки U266 и МКПК человека совместно культивировали в соответствии с условиями, описанными в примере 3. После 48-часовой инкубации клетки осаждали, среду удаляли и клетки ресуспендировали в 50 мкл смеси, содержащей анти-CD45 VioBlue® (Miltenyi, № кат. 130-002-880), анти-CD8 APC-Vio770 (Miltenyi, № кат. 130-096-561) и анти-CD69 PE (BD Pharmingen, № кат. 555531) в FACS-окрашивающем буфере + 2% ФБС. Клетки окрашивали в течение 1 часа при 4 °С при встряхивании, собирали, промывали и ресуспендировали в конечном объеме 60 мкл буфера FACS. Данные собирали на анализаторе MACSQuant® 10 (Miltenyi) и количественно определяли активацию посредством FlowJo® V10 (Treestar) как процент CD8+ Т-клеток с экспрессией CD69 выше изотипического контроля ФЭ. Данные наносили на график в GraphPad PRISM 6 с анализом подгонки кривой.

[0359] На фиг. 3А показано, что активация первичных CD8 + Т-клеток была ослаблена C1106 и C1107 по сравнению с C1011 и C1040. На фиг. 3В показано, что антитела с двойной маскировкой имеют сдвинутую кривую доза-ответ активации Т-клеток относительно активируемого протеазой биспецифического антитела act-104, что указывает на то, что маскирование ослабляет активацию Т-клеток.

ПРИМЕР 5. Биспецифические АА с двойной маскировкой в соответствии с вариантами осуществления индуцировали регрессию установленных опухолей HT29-luc2 у мышей

[0360] В данном примере был проведен анализ способности ВАА с двойной маскировкой C1106 и C1107, нацеленных на EGFR и CD3ε, индуцировать регрессию или уменьшать рост установленных опухолей ксенотрансплантата HT-29-Luc2 у мышей линии NSG с трансплантированными Т-клетками человека.

[0361] Клеточная линия рака толстой кишки человека HT29-luc2 была получена от Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA (ранее Caliper Life Sciences, Inc.) и культивирована в соответствии с установленными процедурами. Очищенные, замороженные человеческие МКПК были получены от Hemacare, Inc., Van Nuys, CA. Мышей линии NSG™ (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) получали от The Jackson Laboratories, Bar Harbor, штат Мэн.

[0362] В день 0 каждой мыши инокулировали подкожно на правом боку 2×10⁶ клеток HT29-luc2 в 100 мкл RPMI + GlutaMax, бессывороточной среде. Ранее замороженные МКПК от одного донора вводили (внутрибрюшинно) в день 3 при соотношении CD3+ Т-

клеток к опухолевым клеткам 1:1. Когда объемы опухоли достигали 200 мм³ (приблизительно на 12 день), мышей рандомизировали, распределяли по группам лечения и вводили внутривенно дозы препаратов в соответствии с таблицей 12. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю.

Таблица 12. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата HT2-9luc2.

| Группа | Число | Обработка | Доза (мг/кг) |
|--------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 7 | ФСБ | Н/Д |
| 2 | 7 | С1106 | 0,5 |
| 3 | 7 | С1106 | 1,5 |
| 4 | 7 | С1107 | 0,5 |
| 5 | 7 | С1107 | 1,5 |

[0363] На фиг. 4 показан объем опухоли в зависимости от количества дней после начальной дозы лечения, что демонстрирует дозозависимое влияние биспецифических АА С1106 и С1107 с двойной маскировкой на рост ксенотрансплантатных опухолей HT29-luc2. Наиболее эффективная испытанная доза составила 1,5 мг/кг, что привело к регрессии опухоли. Статистический анализ (RMANOVA с использованием критерия Даннетта в сравнении с контрольным ФСБ) был выполнен в GraphPad PRISM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.

ПРИМЕР 6. Биспецифические антитела и биспецифические АА с двойной маскировкой в соответствии с вариантами осуществления снижают рост установленных опухолей НСТ116 у мышей

[0364] В данном примере был проведен анализ способности активированного С1104 биспецифического антитела и ВАА с двойной маскировкой С1106 и С1107, нацеленных на EGFR и CD3ε, индуцировать регрессию или уменьшать рост установленных опухолей ксенотрансплантата НСТ116 у мышей линии NSG с трансплантированными Т-клетками человека. Клеточная линия рака толстой кишки человека НСТ116 была получена от АТСС и культивирована в RPMI + GlutaMax + 10% ФБС в соответствии с установленными

процедурами. Модель опухоли обрабатывалась в соответствии с описанием в примере 5. Мышам вводили дозу согласно таблице 13.

Таблица 13. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата НСТ116.

| Группа | Число | Обработка | Доза (мг/кг) |
|--------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 8 | ФСБ | Н/Д |
| 2 | 8 | С1106 | 0,3 |
| 3 | 8 | С1106 | 1,0 |
| 4 | 8 | С1107 | 0,3 |
| 5 | 8 | С1107 | 1,0 |
| 6 | 8 | act-104 | 0,3 |

[0365] На фиг. 5 показан объем опухоли в зависимости от дней после начальной дозы лечения, что демонстрирует дозозависимое влияние биспецифических АА С1106 и С1107 с двойной маскировкой на рост ксенотрансплантатных опухолей НСТ116. Наиболее эффективная испытанная доза составила 1,0 мг/кг, что привело к задержке роста опухоли. Доза 0,3 мг/кг act-104 также приводила к задержке роста опухоли, демонстрируя 3-х кратное различие в эффективности между биспецифическими антителами с двойной маскировкой и активированными протеазой биспецифическими антителами. Статистический анализ (RMANOVA с использованием критерия Даннетта в сравнении с контрольным ФСБ) был выполнен в GraphPad PRISM. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.

ПРИМЕР 7. Перекрестная реактивность биспецифических АА с двойной маскировкой в отношении Т-клеток яванского макака.

[0366] Для подтверждения того, что яванский макак является релевантным видом в отношении токсичности был проведен анализ связывания клеток активированных протеазой С1104, С1106 и С1107 способом проточной цитометрии, а также анализ цитотоксичности NT29-luc2 с использованием пан-Т клеток яванского макака

(BioreclamationIVT), и эффективность сравнивали с человеческими МКПК. Протокол соответствовал описанному в примерах 2 и 3.

[0367] На фиг. 6А и фиг. 6В показано, что ЕС50 оцениваемых в анализе цитотоксичности активируемых протеазой биспецифических антител с двойной маскировкой сходны при использовании эффекторных клеток человека (6А) и яванского макака (6В). На фиг. 6С и фиг. 6D показано сходство связывания активированных протеазой антител с двойной маскировкой с Т-клетками человека (6С) и яванского макака (6D).

[0368] Поэтому было установлено, что яванский макак является подходящим видом для изучения переносимости.

ПРИМЕР 8. Мутации в области Fc влияют на переносимость биспецифических АА с двойной маскировкой у яванских макаков

[0369] В данном примере интактным яванским макакам (n = 1) вводили дозы СИ079 и СИ090 по 600 мкг/кг для оценки переносимости. Начальная доза 600 мкг/кг была выбрана на основе ранее установленной максимальной переносимой дозы СИ011. Обезьяны были китайского происхождения и весили от 2,5 до 4 кг. Каждое исследуемое животное контролировали в течение минимум 7 дней. Переносимость оценивалась на основании клинических признаков, массы тела и потребления пищи. Это исследование было проведено в соответствии со стандартными операционными процедурами в SNBL USA, Ltd. (Everett, Вашингтон).

[0370] В таблице 14 описаны клинические наблюдения после введения доз биспецифических АА (ВАА) с двойной маскировкой СИ079 и СИ090, которые имеют отличия только в областях Fc (таблица 15). СИ079 содержит мутации Fc L234F, L235E и R331S. СИ090 содержит эти мутации Fc и мутацию N297Q. Клинические наблюдения показали отсутствие каких-либо проявлений после введения дозы 600 мкг/кг СИ090, в то время как в первые 24 часа после введения дозы СИ079 наблюдалась рвота, демонстрируя, что мутации в области Fc способствуют переносимости таких молекул.

Таблица 14

| ВАА | Доза (мкпк) | Результаты исследования |
|-------|-------------|--------------------------------|
| СИ079 | 600 | Рвота в течение 1-вых 24 часов |
| СИ090 | 600 | нет клинических наблюдений |

Таблица 15

| ВАА | EGFR, маска и субстрат | CD3, маска и субстрат | Fc |
|-------|------------------------|-----------------------|-------|
| СI079 | 3954 0001 | h20GG 0001 | Fcmt3 |
| СI090 | 3954 0001 | h20GG 0001 | Fcmt4 |

ПРИМЕР 9. Переносимость ВАА с двойной маскировкой у яванских макаков

[0371] В данном примере СI106 и СI107 вводили в дозах 600, 2000, 4000 мкг/кг (только для СI107) или 6000 мкг/кг (только для СI107) для установления максимальной переносимой дозы (MTD) после однократного внутривенного введения болюса интактному яванскому макаку (n = 1). Начальная доза 600 мкг/кг была выбрана на основе ранее установленной максимальной переносимой дозы СI011. Обезьяны были китайского происхождения и весили от 2,5 до 4 кг. Каждое исследуемое животное контролировали в течение минимум 7 дней. Переносимость оценивали на основании клинических проявлений, массы тела, потребления пищи и лабораторных анализов, которые включали химический анализ сыворотки, общий анализ крови, анализ цитокинов и проточную цитометрию для оценки активации Т-клеток. Кровь собирали для стандартного химического анализа сыворотки и общего анализа крови один раз во время акклиматизации и перед введением дозы, через 48 часов, 72 часа (только для общего анализа крови) и через 7 дней после введения дозы. Кровь собирали для анализа цитокинов до введения дозы и через 1, 4, 8 и 24 ч после введения дозы. Проточную цитометрию периферической крови выполняли до введения дозы, через 72 часа и через 7 дней после введения дозы. Это исследование было проведено в соответствии со стандартными операционными процедурами в SNBL USA, Ltd. (Everett, Вашингтон).

[0372] Доза 6000 мкг/кг СI107 привела к летальному исходу в течение 24 часов после введения дозы. В других группах аномальные клинические проявления, включая рвоту и снижение потребления пищи, наблюдались у макаков, получавших СI106 и СI107 в дозах 2000 мкг/кг и выше. Такие проявления, если они присутствовали, были временными и обычно ограничивались 48-часовым периодом после введения дозы. Результаты химического анализа сыворотки при таких дозах включали умеренное повышение уровня аланинтрансаминазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) через 48 ч, которое не превышало нормальных значений. У животных, получавших СI107 в дозе 2000 и 4000 мкг/кг, общий билирубин увеличился, выйдя за пределы нормального диапазона, через 48 часов, и полностью вернулся к исходным значениям на день 8. У животных, получавших как СI106, так и СI107, после введения дозы наблюдалось кратковременное повышение уровней сывороточных цитокинов IL-2, IL-6 и IFNg, которые возвращались к исходным

значениям через 24 ч после введения дозы. Увеличение процента Т-клеток, экспрессирующих CD69, Ki67 и PD-1, наблюдалось через 72 часа после введения дозы, и, как правило, процент положительных клеток был выше у животных, получавших СИ107.

[0373] На фиг. 7А-7С представлены концентрации АЛТ (7А), АСТ (7В) и общего билирубина (7С) в сыворотке до введения и через 48 часов и 7 дней после введения. За исключением общего билирубина в 2000 и 4000 мкг/кг, все значения находятся в установленных нормальных пределах для яванских макаков. Для дозы 6000 мкг/кг СИ107 доступны только данные до введения дозы, они не были включены.

[0374] На фиг. 8А-8С показано увеличение уровней цитокинов в сыворотке для IL-2 (8А), IL-6 (8В) и IFN-g (8С).

[0375] На фиг. 9А-9С изображена активация Т-клеток, измеренная на основании экспрессии CD69 (9А), Ki67 (9В) и PD-1 (9В) в CD4+ Т-клетках.

ПРИМЕР 10. Биспецифические АА с двойной маскировкой показали повышенную безопасность у яванских макаков по сравнению с активированными биспецифическими антителами.

[0376] В данном примере активированные протеазой СИ104 а также СИ106 и СИ107 с двойной маскировкой вводили яванским макакам (n = 1) в дозах 60, 180 (только активированный СИ104), 600, 2000, 4000 мкг/кг (только СИ107) или 6000 мкг/кг (только СИ107) для сравнения переносимости маскированных и немаскированных антител после однократного внутривенного болюса. Оценка переносимости и сбор крови соответствовали описанным в примере 9. ВАА с двойной маркировкой СИ106 и СИ107 переносились при уровне дозы в 30-60 раз выше, чем активированное протеазой биспецифическое антитело.

[0377] На фиг. 10А-Е представлен график дозозависимого увеличения АСТ через 48 ч после введения дозы (10А), АЛТ через 48 ч после введения дозы (10В), IL-6 через 8 ч после введения дозы (10С), IFNg через 8 ч после введения дозы (10D) и Ki67 через 72 ч после введения дозы (10Е). Кривая доза-ответ для всех параметров у антител с двойной маскировкой была сдвинута, что указывает на улучшение переносимости и снижение фармакодинамических эффектов по сравнению с активируемым протеазой биспецифическим антителом. В некоторых вариантах осуществления кривая доза-ответ IL-6 была смещена более чем в 60 раз.

ПРИМЕР 11. Переносимость связывающих EGFR биспецифических АА с двойной маскировкой зависит от EGFR.

[0378] В данном примере биспецифические антитела с двойной маскировкой С1107, нацеленные на EGFR и CD3ε, а также С1128, нацеленные на RSV и CD3ε, вводились яванским макакам в дозе 2000 мкг/кг (n = 1). Оценка переносимости и сбор крови соответствовали описанным в примере 9 выше. Не наблюдалось влияния С1128 на показатели острой токсичности для органов (общий билирубин) и активации Т-клеток (IL-6, PD-1), что свидетельствует о том, что токсичность, наблюдаемая у яванских макаков, зависит от связывания EGFR. Эти данные также показывают, что только связывания CD3ε недостаточно для вызова токсичности.

[0379] На фиг. 11А-11С показано сравнение влияния EGFR-связывающего С1107 и не связывающего EGFR С1128 на увеличение общего билирубина (11А), IL-6 (11В) и экспрессирующих PD-1 CD4+ Т-клеток (11С).

ПРИМЕР 12. Гуманизация анти-CD3 вариантов v12, v16 и v19, имеющих различные аффинности и активность.

[0380] В данном примере описаны варианты антител к CD3 v12, v16 и v19. Данные три варианта были получены из родительского антитела hSP34

[0381] Гуманизацию одноцепочечного переменного фрагмента CD3 человека (scFv) осуществляли путем избирательной мутации каркаса. Вкратце, CDR были встроены в ряд каркасов легкой цепи (LC) и тяжелой цепи (HC) человеческого IgG, и ряд аминокислот в структуре переменной области был избирательно мутирован. Иммуноглобулины экспрессировали во всех возможных комбинациях LC и HC, а затем оценивали уровень экспрессии, процентное содержание мономера и аффинность CD3 с использованием ИФА и связывания на клетке с клетками Jurkat. Переменные области желаемых комбинаций экспрессировались в виде scFv в формате биспецифического антитела (ТСВ) и затем проводилась оценка уровня экспрессии, процентного содержания мономера, аффинности CD3 и функции в анализах цитотоксичности клеток.

[0382] Аффинность вариантов v12, v16 и v19 измеряли с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Поверхности представляли собой карбоксилированный гидрогель HC200m на основе линейного синтетического поликарбоксилата. Поверхностные каналы активировали с помощью стандартных протоколов сопряжения амина EDC/NHS. Каналы 1 и 2 были пустыми, каналы 3 и 4 представляли собой различные антитела к CD3 человека. Поверхности получали

разбавлением антител v12, v16, v19 и ММ194 до 5 мкг/мл в 1,0 мл 10 мМ ацетата натрия, рН 4,5.

[0383] Кинетический анализ проводили в PBST (10 мМ фосфатов натрия, рН 7,4, 150 мМ хлорида натрия, 0,05% Твин-20) при 20 °С. Регенерация представляла собой серию из трех инъекций; однократную инъекцию 5 мкл 20 мМ гидроксида натрия с последующим двумя инъекциями по 5 мкл 10 мМ свежеприготовленного гидроксида натрия.

[0384] Конфигурация была выполнена с обратным 3-кратным серийным разведением, чередующимся с буферными пробами. Человеческий CD3egFc был приобретен в компании Sino Biological Inc. (Пекин, Китай, № кат. СТ041-Н0305Н) и восстановлен стерильной водой из лиофилизированного состава на основе ФСБ и стабилизаторов. Последовательные разбавления аналита в растворе от концентраций, начиная с 300 нМ или 100 нМ CD3 человека. Обработка выполнялась с помощью программного обеспечения Scrubber.

[0385] Эти варианты также были сконструированы с использованием описанных способов в биспецифические АА с двойной маскировкой, нацеленные на EGFR и CD3, и использовались в анализе цитотоксичности *in vitro*, как описано в примере 3.

[0386] На фиг. 12А показаны измерения аффинности v12, v16 и v19 относительно hSP34. V12 показало наивысшую аффинность при 12 нМ, тогда как v16 показал наименьшую при 70 нМ.

[0387] На фиг. 12В показана цитотоксичность активированных антител или биспецифических антител с двойной маскировкой на клетках HT29-luc2. Наблюдались небольшие различия в активности уничтожения клеток активированными молекулами, причем v16 был наиболее эффективным. Также наблюдались небольшие различия в защите от гибели клеток для молекул с двойной маскировкой.

ПРИМЕР 13. ВАА с двойной маскировкой допускает расширенную ФК у яванских макаков.

[0388] В данном примере активированное протеазой биспецифическое антитело act-104 и биспецифическое антитело С1107 с двойной маскировкой вводилось яванским макакам в дозе 60 мкг/кг, 180 мкг/кг (act-104) или 2000 мкг/кг (С1107). Образцы плазмы собирали через 5 минут (только act-104), 30 минут, 4 часа (только act-104), 24 часа, 48 часов (только act-104), 96 часов и 168 часов. Концентрацию в плазме измеряли с помощью ИФА, используя антиидиотипическое антитело для захвата, пероксидазу хрена (HRP), меченную анти-человеческим IgG (Fc) для обнаружения, и визуализировали с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Значения концентрации в плазме интерполировали

на основании стандартной кривой и наносили на график с использованием GraphPad PRISM. Также был выполнен анализ площади под кривой (AUC).

[0389] На фиг. 13 показана расширенная ФК молекулы с двойной маскировкой, CI107, относительно активированной протеазой молекулы, act-104. Содержание (AUC) CI107 составляло 448 суток*нМ, а act-104 (60 мкг/кг) — 0,04 суток*нМ, что представляет собой разницу в содержании в плазме более чем в 10 000 раз.

ПРИМЕР 14. Чувствительность к расщеплению протеазой биспецифических АА с двойной маскировкой коррелирует с эффективностью в отношении опухоли и инфильтрацией Т-клеток опухоли.

[0390] Данный пример описывает противоопухолевую эффективность и инфильтрацию опухолевых Т-клеток на модели ксенотрансплантата HT29-luc2. Модель обрабатывалась в соответствии с описанием в примере 5. В исследовании инфильтрации Т-клеток опухоли мышам вводили однократную дозу испытуемого изделия, и опухоли собирали через 7 дней после введения дозы. Блоки с формалиновым фиксированным парафином (FFPE) были созданы для использования в гистологических целях. Используемые тестовые изделия: CI011, CI020 (биспецифическое антитело с двойной маскировкой, лишенное расщепляемого субстрата), CI040 и CI048. Чувствительность к протеазе и расщепляемость субстрата испытуемых изделий следующие: CI040 > CI011 > CI020. Мышам вводили дозу согласно таблице 16.

Таблица 16. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата HT29-luc2.

| Группа | Число | Обработка | Доза (мг/кг) | Исследование |
|--------|-------|-----------|--------------|---------------|
| 1 | 8 | ФСБ | Н/Д | Эффективность |
| 2 | 8 | CI011 | 0,3 | Эффективность |
| 3 | 8 | CI020 | 0,3 | Эффективность |
| 4 | 8 | CI040 | 0,3 | Эффективность |
| 5 | 8 | CI048 | 0,3 | Эффективность |
| 6 | 5 | ФСБ | Н/Д | Инфильтрация |

| | | | | |
|----|---|-------|-----|--------------|
| 7 | 5 | СI011 | 1,0 | Инфильтрация |
| 8 | 5 | СI020 | 1,0 | Инфильтрация |
| 9 | 5 | СI040 | 1,0 | Инфильтрация |
| 10 | 5 | СI048 | 1,0 | Инфильтрация |

[0391] На фиг. 14А показана эффективность на модели вмешательства на опухоли HT29-luc2 у мышей NSG с трансплантированными МКПК. Противоопухолевая активность в данном примере коррелирует с чувствительностью к протеазе и расщепляемостью субстрата тестируемых вариантов, причем наиболее эффективным тестируемым вариантом является полностью активированный протеазой СI048.

[0392] На фиг. 14В показано окрашивание срезов опухоли для выявления CD3 (окрашивание в темноте) в качестве меры степени инфильтрации Т-клеток в опухоли. Инфильтрация Т-клеток в опухоль коррелирует с чувствительностью к протеазе и расщепляемостью субстрата тестируемых вариантов.

ПРИМЕР 15. биспецифические АА с двойной маскировкой второго поколения показали повышенную безопасность у яванских макаков по сравнению с молекулами первого поколения.

[0393] В данном примере проводили сравнение данных о переносимости у яванских макаков для СI011, СI040, СI048 (молекулы первого поколения), аст-104, СI106 и СI107 (молекулы второго поколения). Данные, представленные в этом примере, были собраны из двух исследований переносимости у яванских макаков. Активированные протеазой СI104 и СI048 вводили яванским макакам в дозе 20 (только для СI048), 60 или 180 мкг/кг (только для аст-104). СI011, СI040, СI106 и СI107 с двойной маскировкой вводили в дозах 600, 2000, 4000 (только для СI107) или 6000 (только для СI107) мкг/кг для сравнения переносимости активированных биспецифических антител и антител с двойной маскировкой после однократного внутривенного болюса. Оценка переносимости соответствовала описанной в примере 8.

[0394] В таблице 17 приведены итоговые клинические наблюдения после однократного приема тестируемого изделия. Второе поколение активированного протеазой биспецифического антитела аст-104 переносилось в 2 раза большей дозе по сравнению с активированным протеазой биспецифическим антителом СI048 первого поколения. СI106

и СИ107 переносились в 30–60 раз большей дозе, чем антитела первого поколения СИ011 и СИ040.

Таблица 17

| ВАО | Доза (мкг/кг/сут.) | Клинические наблюдения |
|------------------|-----------------------------|---|
| СИ048 | 20 (n=2) 60 | 1. Рвота и сгорбленная поза в 1- ^{вые} 24 часа 2. Отсутствует Рвота в 4 часа; сгорбленная поза в течение 4 суток, отсутствие аппетита в течение 2 суток; потеря веса 10% |
| СИ011 | 600 (n=3) 2000 | 1. Отсутствует 2. Рвота в 4 часа, отсутствие аппетита в день 4 3. Сгорбленная поза и отсутствие аппетита до дня 5. Потеря веса 5% Рвота в дни 1–2, отсутствие аппетита в дни 2–4 |
| СИ040 | 600 (n=2) 2000 | 1. Рвота в 4 часа 2. Рвота в течение 12 часов, отсутствие аппетита в день 4 Рвота в дни 1–2, агония и усыпление в день 2 |
| act-104 СИ104 | 60 180 | Рвота и сгорбленная поза в 1- ^{вые} 24 часа Тяжелая рвота; сгорбленная поза, бледность, отсутствие аппетита продолжительностью 3 дня |
| СИ106 | 600 2000 | отсутствует отсутствует |
| СИ107 | 600 2000 4000 6000 | Отсутствует Рвота, один раз в 1- ^{вые} 24 часа Рвота, множественные случаи в 1- ^{вые} 24 часа Тяжелая рвота; кровавая диарея |

ПРИМЕР 16. Оценка маскирующей эффективности активируемых антител к EGFR

[0395] Маскирование способности антитела связываться с его антигеном является примером ингибирования связывания и указано в данном документе как эффективность маскировки (ЭМ). Эффективность маскировки может быть рассчитана как K_D связывания АА, деленное на K_D связывания антитела, измеренного в тех же условиях. Степень ингибирования зависит от аффинности антитела к его антигену, аффинности ингибитора (то есть, маскирующего фрагмента) к антителу и концентрации всех реагентов.

Локальные концентрации пептида связанного маскирующего фрагмента (ингибитора) очень высоки в контексте АА, порядка 10 нМ, поэтому пептиды с умеренной аффинностью будут эффективно маскировать связывание антигена АА.

[0396] Общая схема данного анализа следующая: планшеты Nunc, Maxisorp™ в течение ночи при температуре 4 °С покрывали раствором 1 мкг/мл человеческого EGFR (R и D систем) в ФСБ, рН 7,4, 100 мкл/лунку. Планшеты промывали 3X PBST (ФСБ, рН 7,4, 0,05% твин-20), и лунки блокировали 200 мкл/лунку 10 мг/мл BSA в PBST в течение 2 часов при комнатной температуре. Планшеты промывали 3X PBST (PBS, рН 7,4, 0,05% твин-20). Кривые разведения могут быть получены в 10 мг/мл BSA в PBST, как показано ниже в таблице 18. В данном примере самые высокие концентрации составляют 10 нМ для родительского антитела и 400 нМ для АА, однако максимальные концентрации могут быть увеличены или уменьшены для получения кривых связывания полного насыщения для АА с более сильным или более слабым маскированием.

Таблица 18. Схема планшетов для анализа эффективности маскировки.

| | [антитело] = нМ Колонки 1–3 | [АА 1] = нМ Колонки 4-6 | [АА 2] = нМ Колонки 7-9 | [АА 3] = нМ Колонки 10-12 |
|---|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| A | 10 | 400 | 400 | 400 |
| B | 2 | 100 | 100 | 100 |
| C | 0,625 | 25 | 25 | 25 |
| D | 0,156 | 6,25 | 6,25 | 6,25 |
| E | 0,039 | 1,56 | 1,56 | 1,56 |
| F | 0,0097 | 0,39 | 0,39 | 0,39 |
| G | 0,0024 | 0,098 | 0,098 | 0,098 |
| H | 0,0006 | 0,024 | 0,024 | 0,024 |

[0397] Связывающие растворы добавляли в планшеты, которые затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем промывали 3X PBST (ФСБ, рН 7,4, 0,05% твин-20). Добавляли 100 мкл/лунку 1:4000 козьего анти-человеческого IgG (Fab-специфичный, Sigma cat № A0293) в 10 мг/мл BSA в PBST и планшет инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет разработан с TMB и 1N HCL. На фиг. 15 и фиг. 16 представлены графики изотермы связывания для активируемых антител к EGFR C225v5 по настоящему изобретению, для активируемых антител к EGFR 3954-2001-C225v5, описанных выше, и для антитела к EGFR C225v5. Графики создаются в

GraphPad PRISM, данные подгоняются к модели насыщения одного участка и определяется K_D . Значения K_D и ME приведены в таблице 19.

Таблица 19. Значения K_D и ЭМ, рассчитанные по изотермам связывания, показанным на фиг. 15 и фиг. 16.

| | K_D (нМ) | ЭМ |
|------------------|------------|-----|
| 3954-2001-C225v5 | 13 | 130 |
| CF08-2001-C225v5 | 0,2 | 2 |
| CF13-2001-C225v5 | 0,3 | 3 |
| CF19-2001-C225v5 | 27 | 270 |
| CF22-2001-C225v5 | 78 | 780 |
| CF41-2001-C225v5 | 52 | 520 |
| CF46-2001-C225v5 | 1 | 10 |

ПРИМЕР 17. Фармакокинетика ВАА с двойной маскировкой у яванских макаков.

[0398] В данном примере биспецифическое антитело С1107 с двойной маскировкой вводилось японским макакам в дозе 600 мкг/кг, 2000 мкг/кг или 4000 мкг/кг. Образцы плазмы собирали через 30 минут, 4 часа (только 600 мкг/кг), 24 часа, 48 часов (только 600 и 4000 мкг/кг), 96 часов и 168 часов. Концентрацию в плазме измеряли с помощью ИФА, как в примере 13.

[0399] На фиг. 20 показана фармакокинетика ВАА с двойной маскировкой С1107 после введения в/в однократной дозы 600, 2000 или 4000 мкг/кг.

ПРИМЕР 18. EGFR-зависимая цитотоксичность биспецифических активируемых антител с двойной маскировкой

[0400] Для определения того, способны ли анти-CD3 ϵ , маска CD3 и субстраты протеазы в С1090 и С1091 дополнительно ослаблять гибель клеток относительно С1011, был проведен анализ цитотоксичности с использованием способа, описанного в примере 3. Были протестированы титры следующих биспецифических активированных антител и биспецифических активируемых антител с двойной маскировкой: С1011, С1090, С1091, активированные С1090 и С1048. Кроме того, биспецифическое активируемое антитело С1064, не связывающееся с EGFR, использовали для демонстрации зависимости цитотоксичности от EGFR.

[0401] На фиг. 21 показано, что уничтожение клеток EGFR⁺ HT29-luc2 было дополнительно ослаблено С1090 и С1091 по сравнению с С1011, однако активность

активированного СИ090 эквивалентна СИ048. Сдвиг EC50 СИ090 и СИ091 относительно активированного биспецифического антитела увеличивается, отражая повышенную эффективность маскировки этих молекул относительно СИ011. Цитотоксичность не наблюдалось при обработке клеток СИ064, что демонстрирует зависимость нацеливания EGFR для уничтожения клеток.

ПРИМЕР 19. Первичная активация Т-клеток биспецифическими активируемыми антителами с двойной маскировкой

[0402] Для определения того, способны ли анти-CD3ε, маска CD3 и субстраты протеазы в СИ090 и СИ091 ослаблять первичную активацию Т-клеток относительно СИ011, был проведен анализ способом проточной цитометрии в соответствии с описанным в примере 4.

[0403] На фиг. 22 показана дополнительно ослабленная активация первичных CD8+ Т-клеток СИ090 и СИ091 относительно СИ011.

ПРИМЕР 20. Биспецифические активируемые антитела с двойной маскировкой в соответствии с вариантами осуществления индуцировали регрессию установленных опухолей HT29-luc2 у мышей

[0404] В данном примере анализировали способность биспецифических активируемых антител СИ011, СИ090 и СИ091 индуцировать регрессию или уменьшать рост установленных опухолей ксенотрансплантата HT-29-Luc2 у мышей NSG, которым трансплантировали МКПК человека. Способ соответствовал описанному в примере 5.

Таблица 20. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата HT-29-luc2.

| Группа | Число | Обработка | Доза (мг/кг) |
|--------|-------|-----------|--------------|
| 1 | 7 | ФСБ | Н/Д |
| 2 | 7 | СИ011 | 1,0 |
| 3 | 7 | СИ090 | 1,0 |
| 4 | 7 | СИ091 | 1,0 |

[0405] На фиг. 23, которая показывает объем опухоли в зависимости от дней после начальной дозы лечения, показано, что еженедельная доза в 1 мг/кг индуцировала регрессию опухоли для всех протестированных биспецифических активируемых антител.

ПРИМЕР 21. Биспецифические активируемые антитела с двойной маскировкой вызывают меньшее выделение цитокинов у яванских макаков, чем активированные биспецифические антитела.

[0406] В данном примере активированные протеазой CI104, и CI011, CI090 и CI091 с двойной маскировкой вводили яванским макакам ($n = 1$) в дозах 0,06, 0,18 (активированный CI104) или 600 мг/кг (CI011, CI090, CI091). Кровь собирали для анализа цитокинов до введения дозы и через 1, 4, 8 и 24 ч после введения дозы. Образцы анализировали с использованием комплекта панелей Life Technologies Monkey Magnetic 29-Plex (№ продукта LCP0005M). Данные были получены на приборе BioRad BioPlex 200. Данный анализ был проведен в соответствии со стандартными операционными процедурами в SNBL USA, Ltd. (Эверетт, Вашингтон).

[0407] На фиг. 24 показан график уровней IL-6 через 8 часов после введения дозы. Биспецифическое активируемое антитело с двойной маскировкой CI011 индуцирует значительно меньшее высвобождение цитокинов, чем активированное CI104, даже при введении в более высокой дозе, демонстрируя влияние маскировки на активацию Т-клеток. Уровень IL-6 еще больше снижается у животных, получавших CI090 и CI091, что демонстрирует повышенную эффективность маскировки этих молекул по сравнению с CI011.

Другие варианты реализации

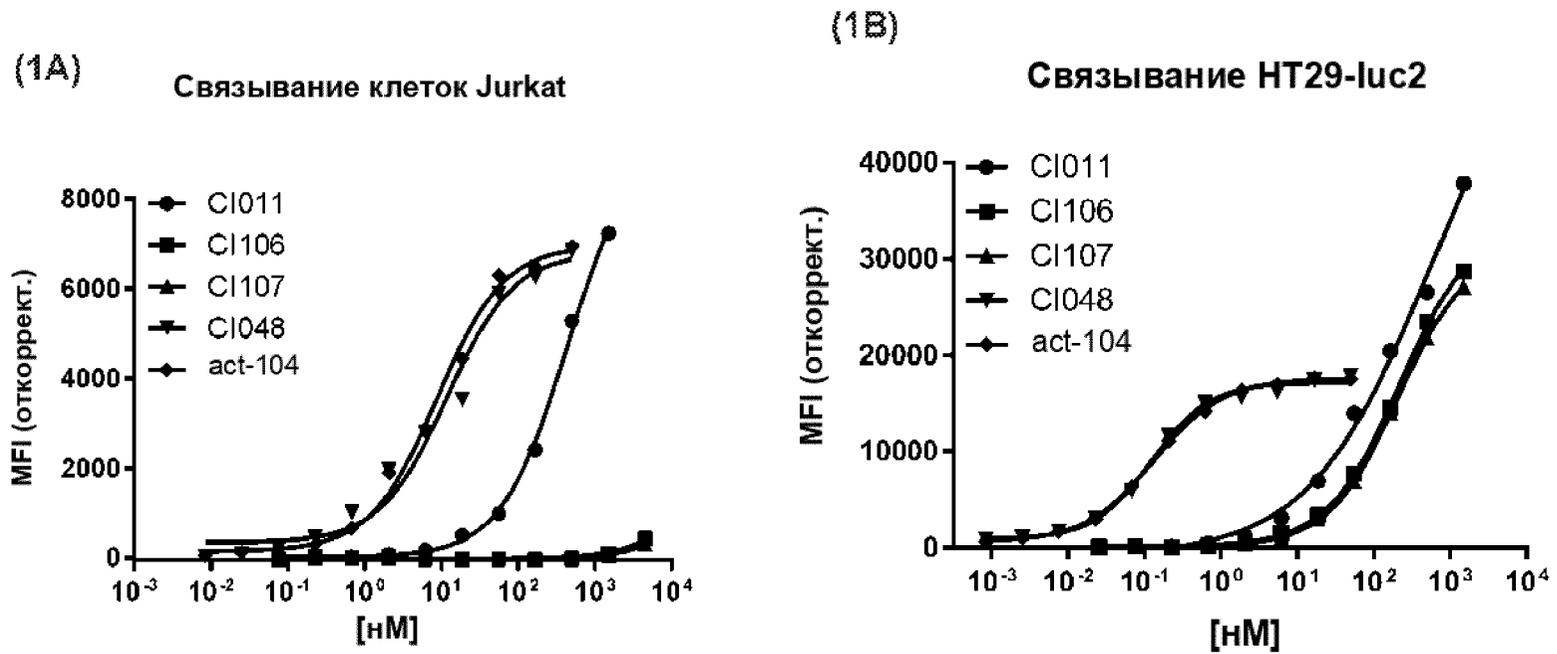
[0408] Хотя настоящее изобретение было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках объема следующего.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий маскирующий фрагмент (ММ), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.
2. Полипептид по п. 1, дополнительно содержащий расщепляемый фрагмент (СМ).
3. Полипептид по п. 2, где СМ включает субстрат, расщепляемый сериновой протеазой или матриксной металлопротеиназой (ММР).
4. Полипептид по п. 3, где протеаза представляет собой ММР.
5. Полипептид по п. 3, где протеаза представляет собой сериновую протеазу.
6. Полипептид по п. 5, где сериновая протеаза представляет собой матриптазу или uРА.
7. Полипептид по п. 2, содержащий линкер между ММ и СМ.
8. Полипептид по п. 2, в котором ММ и СМ не разделены линкером.
9. Полипептид по п. 2, содержащий линкер на карбоксильном конце СМ.
10. Полипептид по п. 2, содержащий формулу, выбранную из группы, состоящей из:
 - i) (ММ)-L1-(СМ);
 - ii) (ММ)-(СМ)-L2;
 - iii) (ММ)-L1-(СМ)-L2 и
 - iv) (ММ)-(СМ),в направлении от N- к С-концу или в направлении от С- к N-концу, где L1 и L2 представляют собой линкеры.
11. Полипептид по п. 10, где L1 и L2 одинаковые.

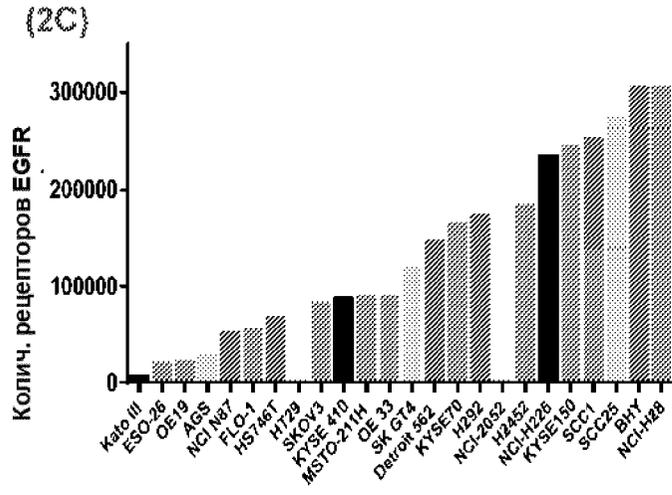
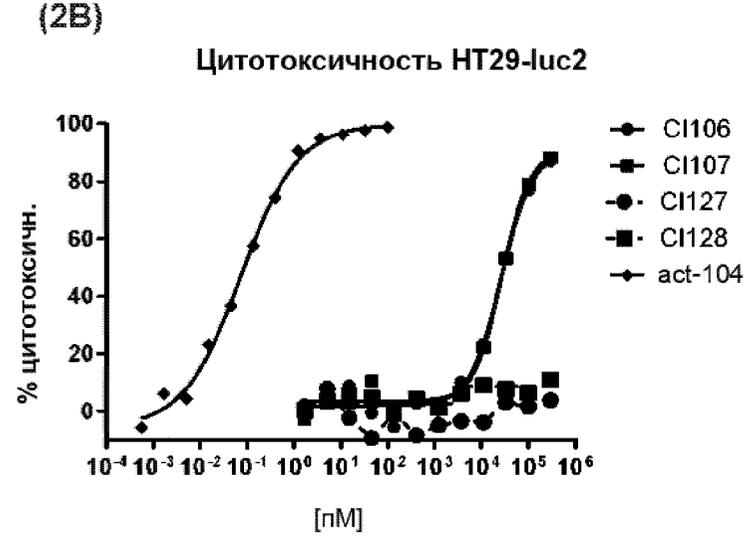
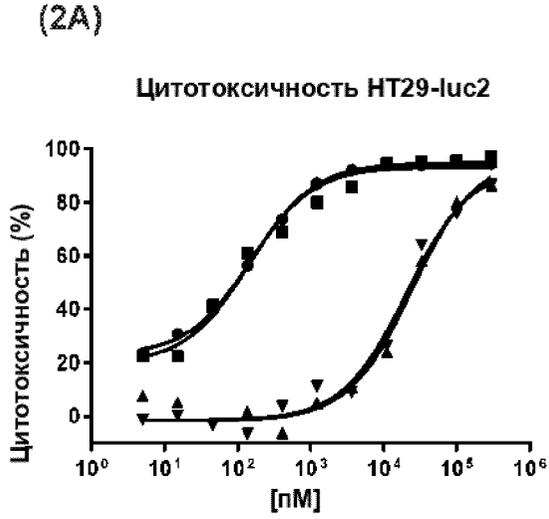
12. Полипептид по п. 10, где L1 и L2 разные.
13. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по п. 1.
14. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 13.
15. Способ получения полипептида путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии полипептида, причем клетка содержит вектор по п. 14.
16. Способ производства полипептида, включающий:
 - а) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид по п. 1, для экспрессии полипептида, и
 - б) выделение расщепляемого полипептида.

ФИГ. 1А-1В

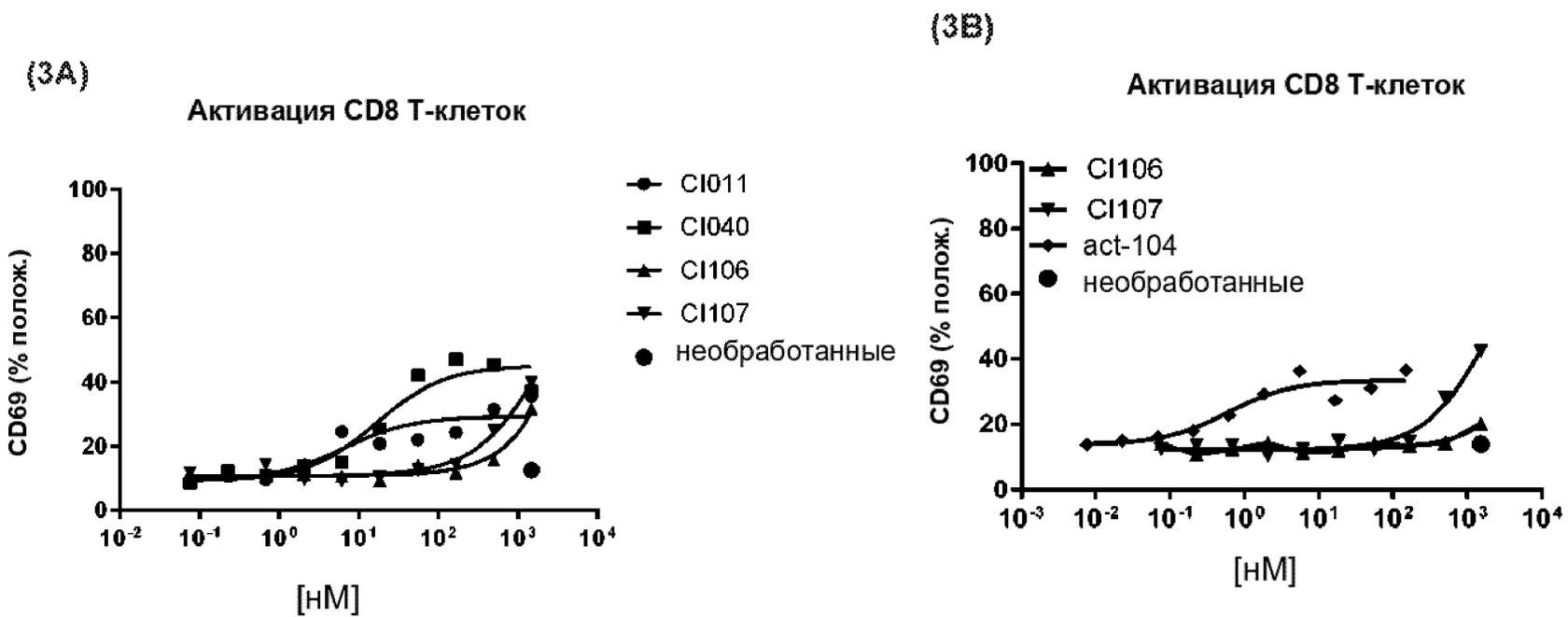


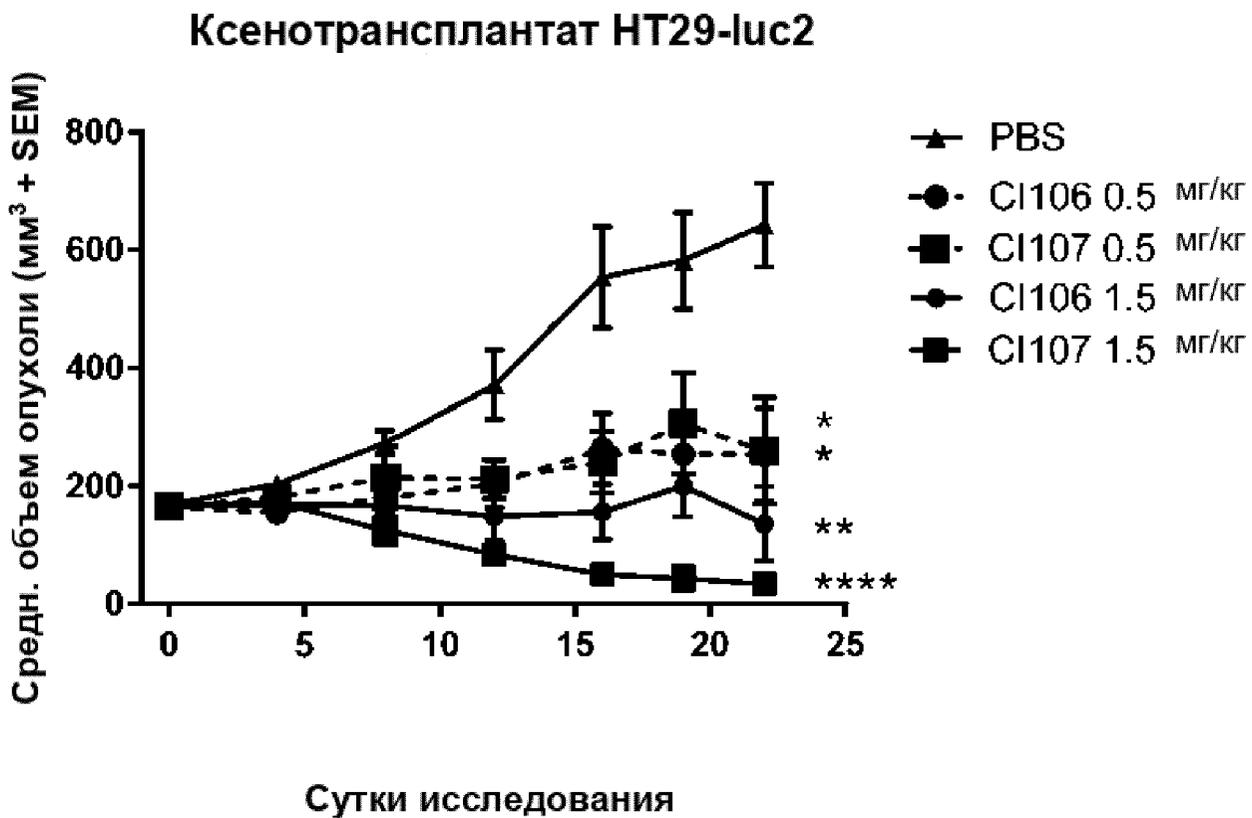
Антитела, активируемые антителом, биспецифические антитела и биспецифические активируемые антитела и способы их применения

ФИГ. 2А-2С



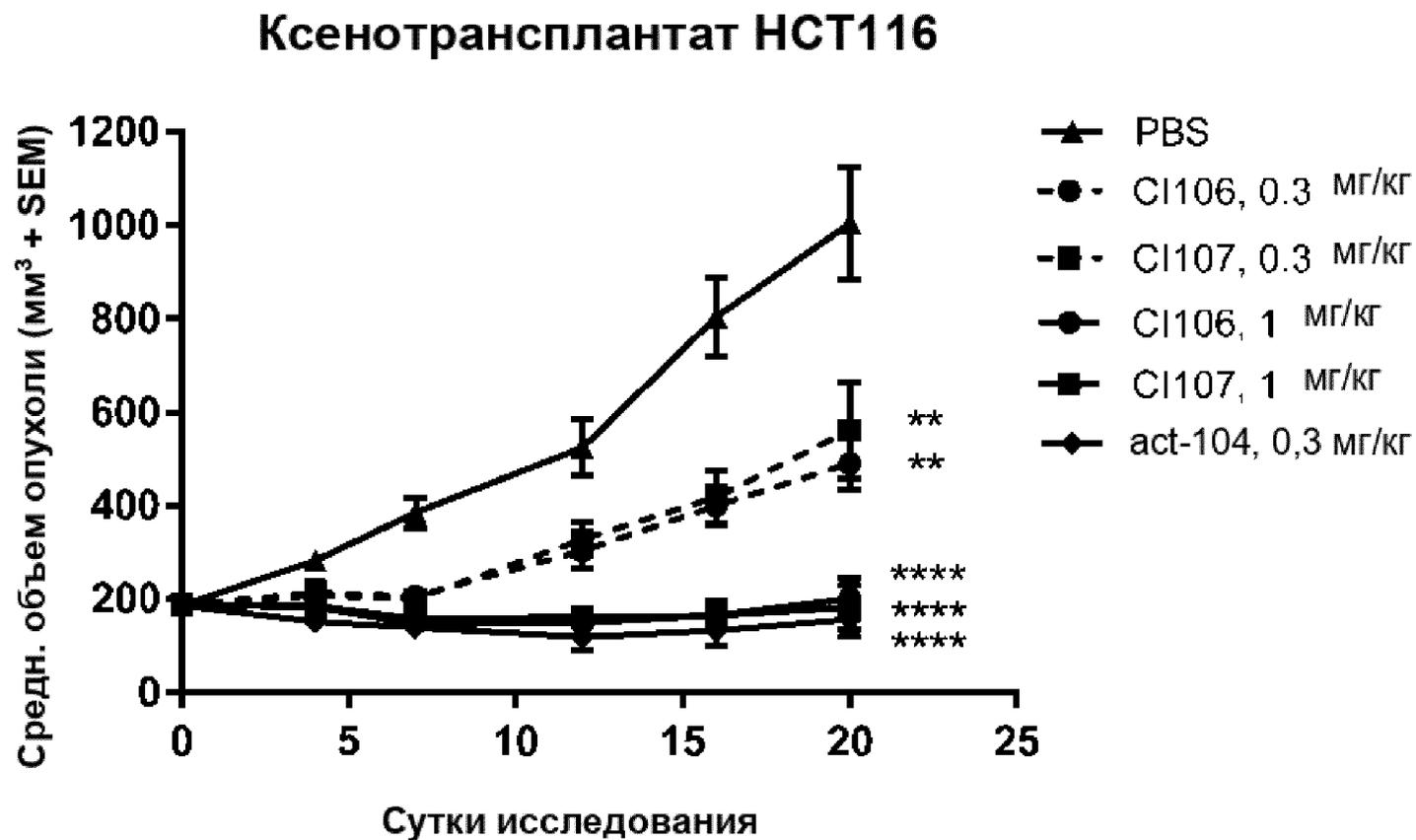
ФИГ. 3А-В



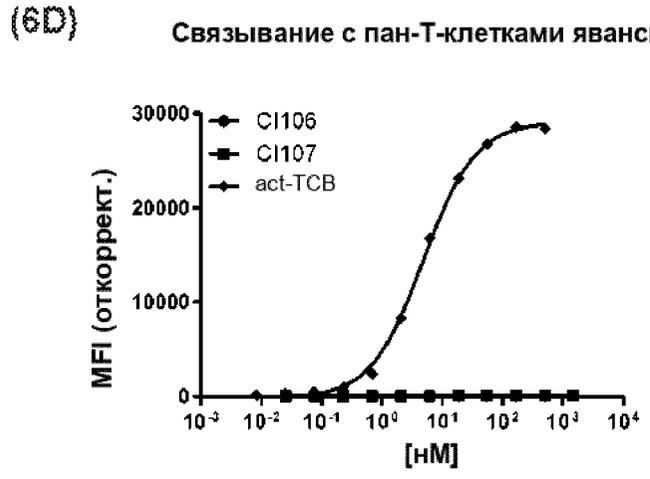
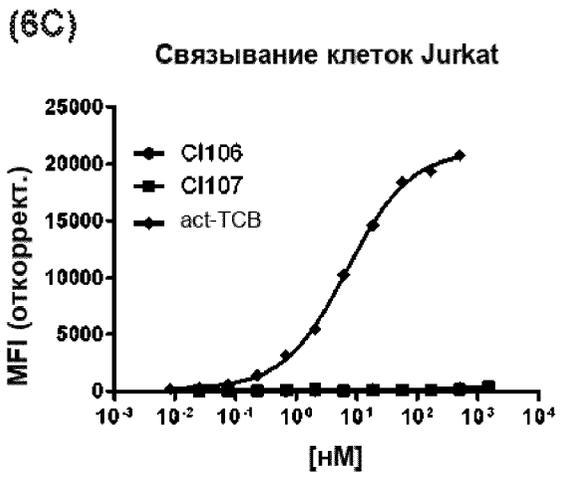
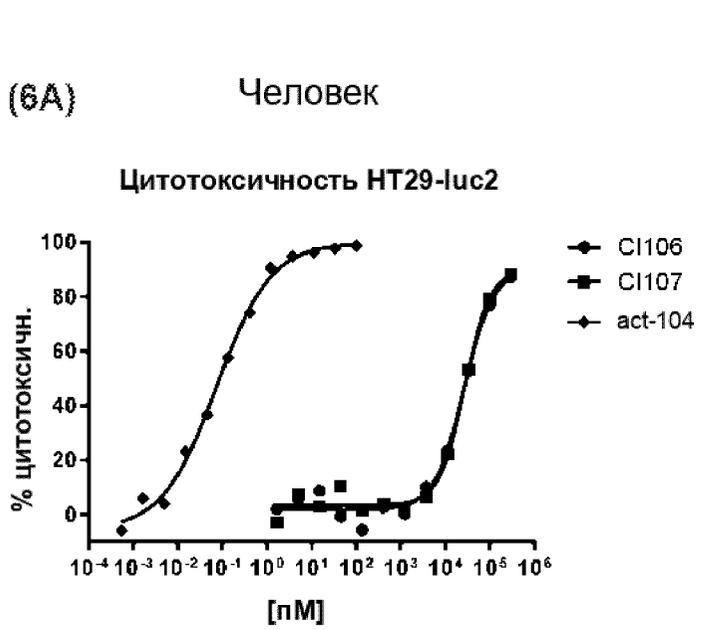


ФИГ. 4

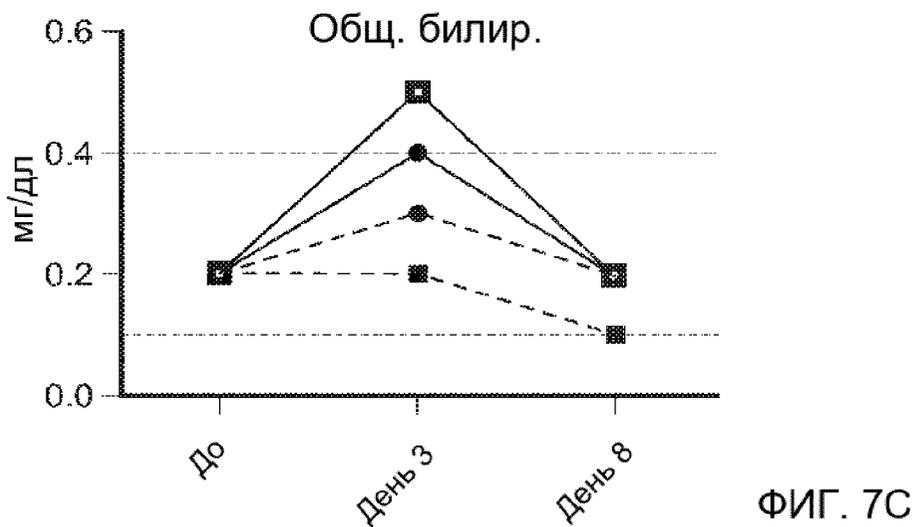
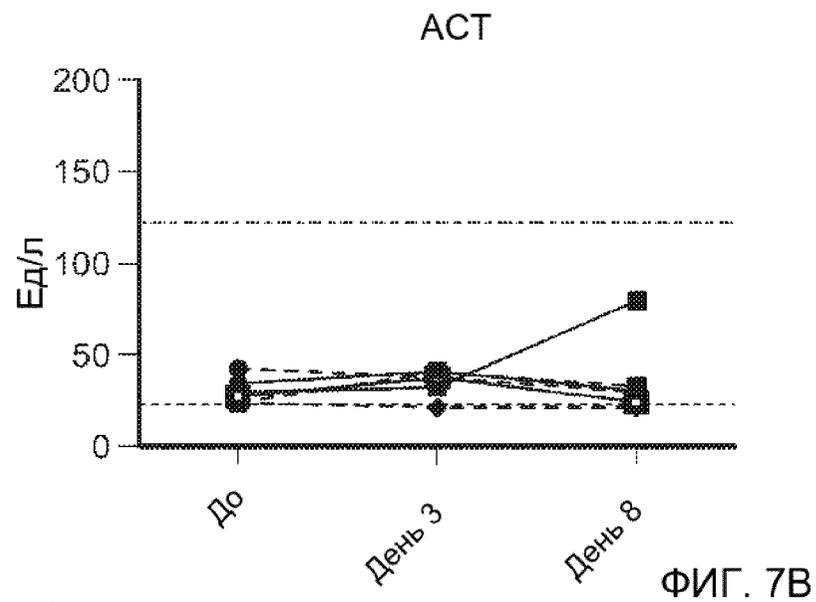
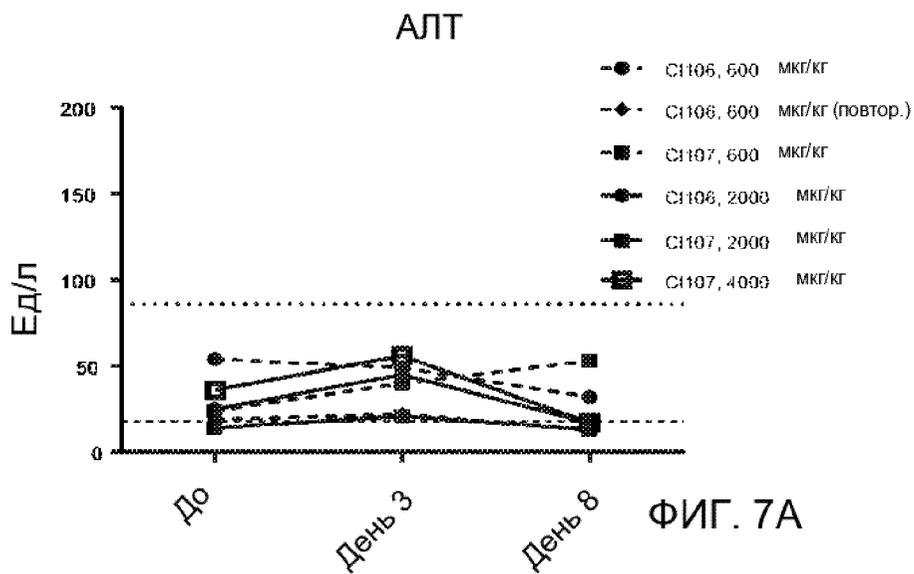
ФИГ. 5



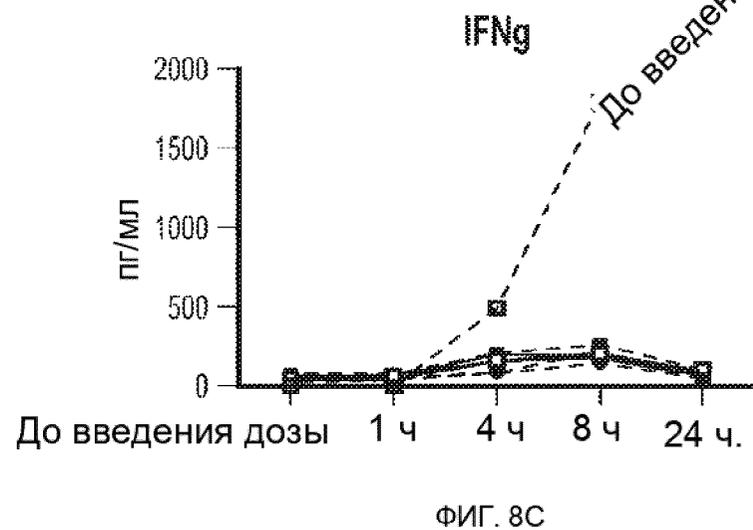
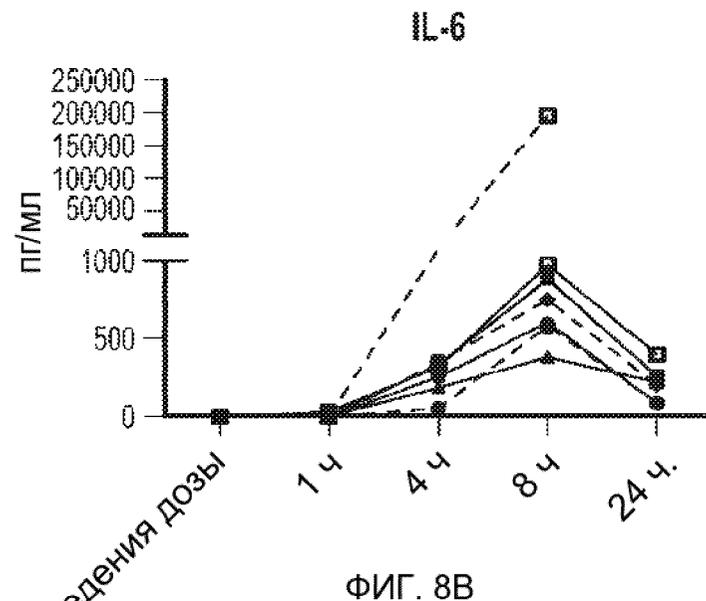
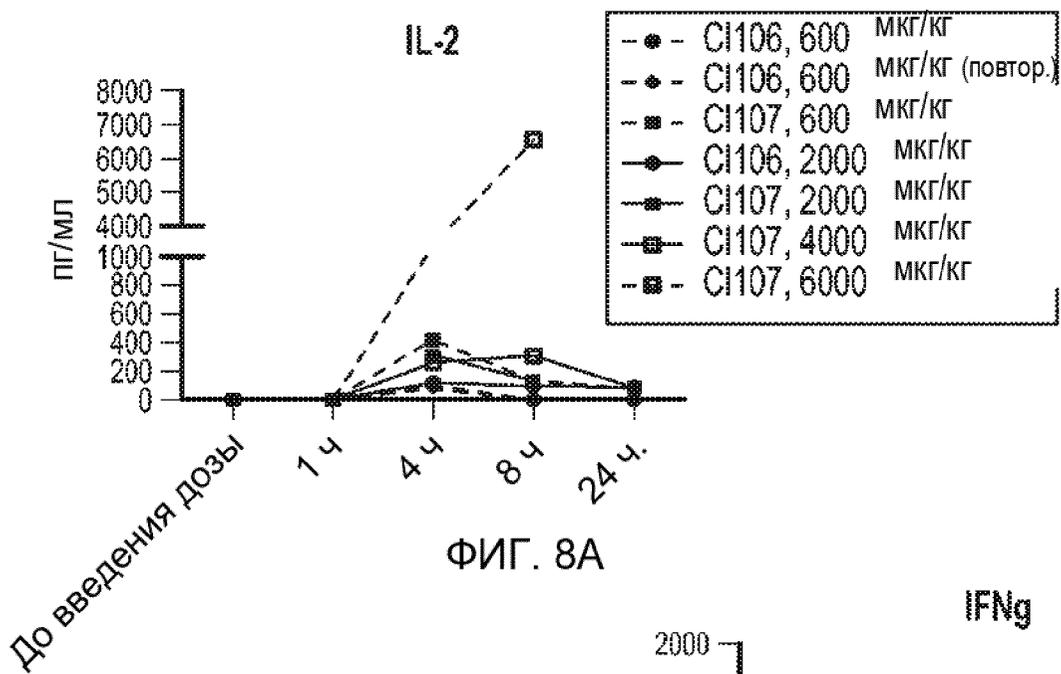
ФИГ. 6А-6D



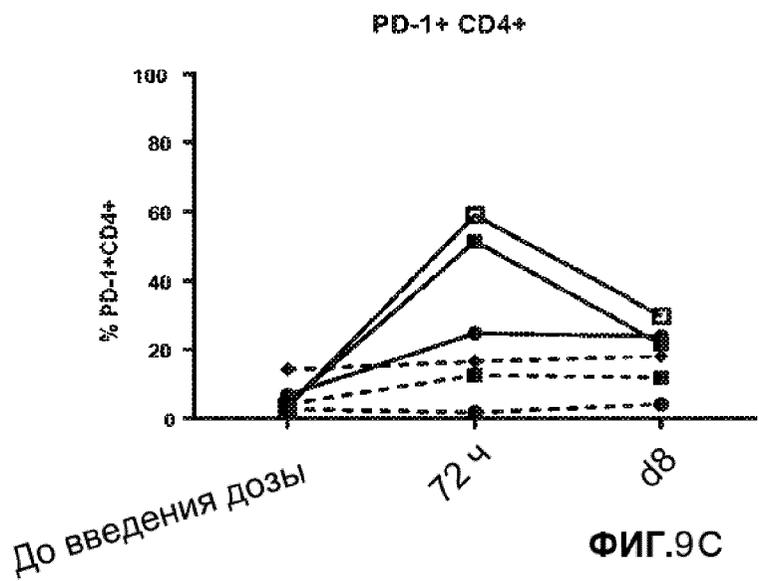
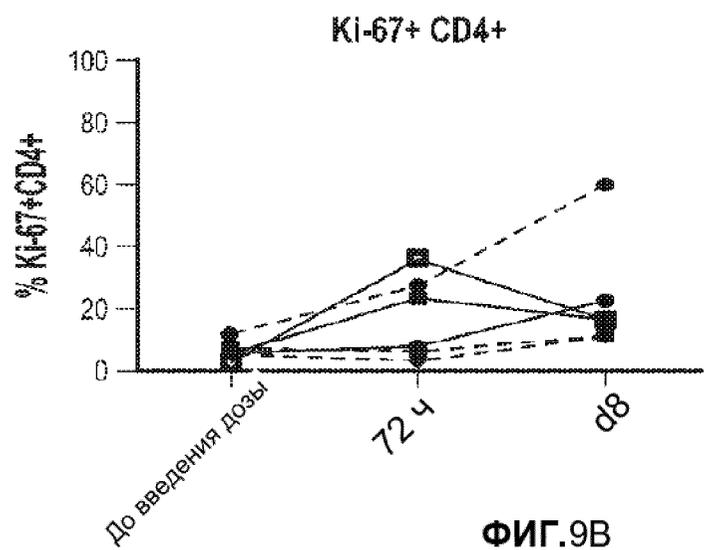
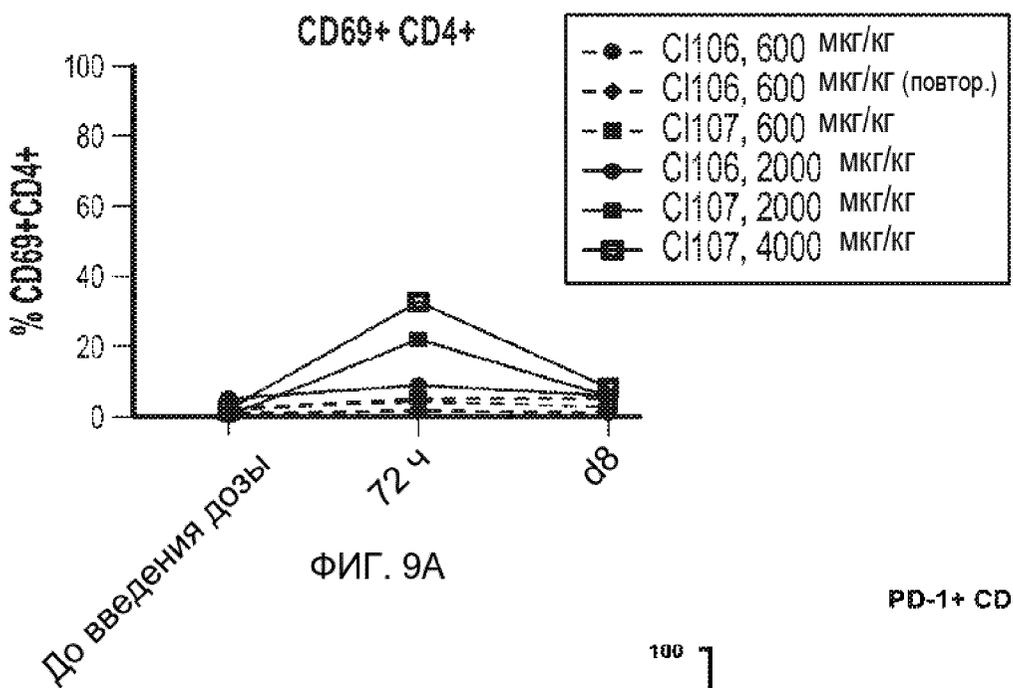
Антигена, активизируемые антигена, биспецифические антигена
и биспецифические активизируемые антигена и способы их применения



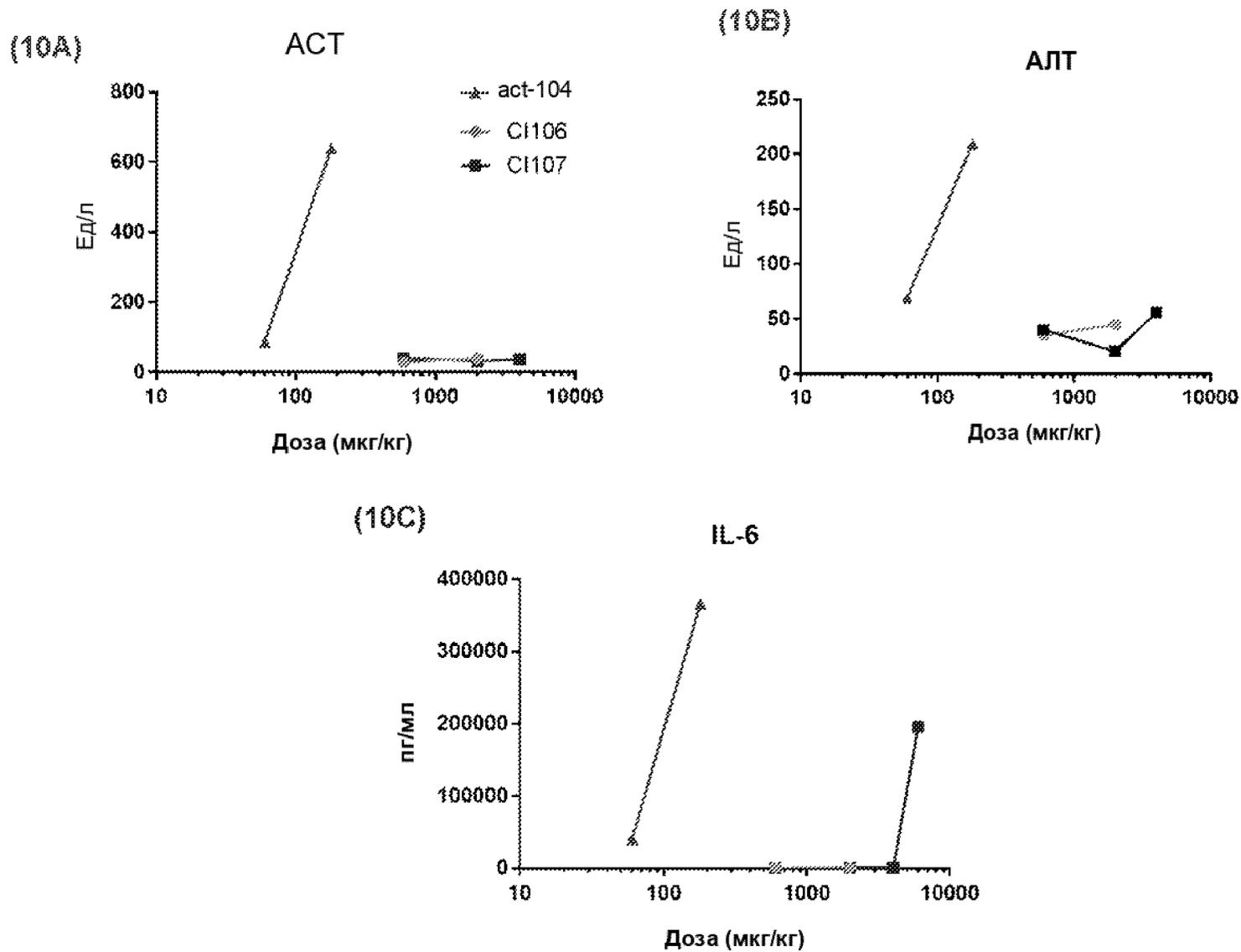
Антигена, активируемые антигена, биспецифические антигена
и биспецифические активируемые антигена и способы их применения



Антигена, активируемые антигена, биспецифические антигена
и биспецифические активируемые антигена и способы их применения

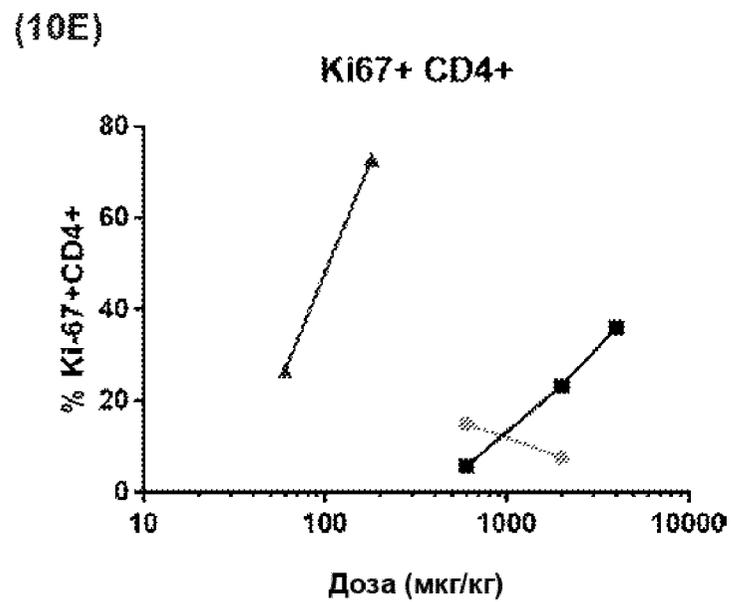
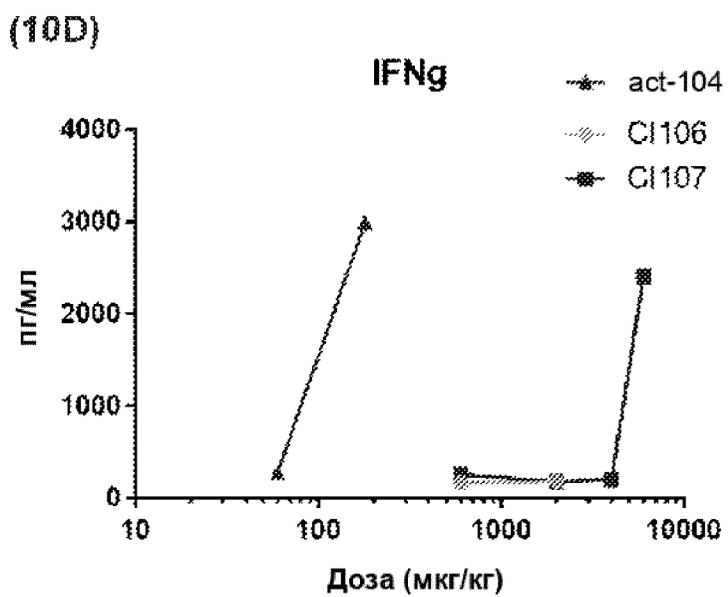


ФИГ. 10А-С

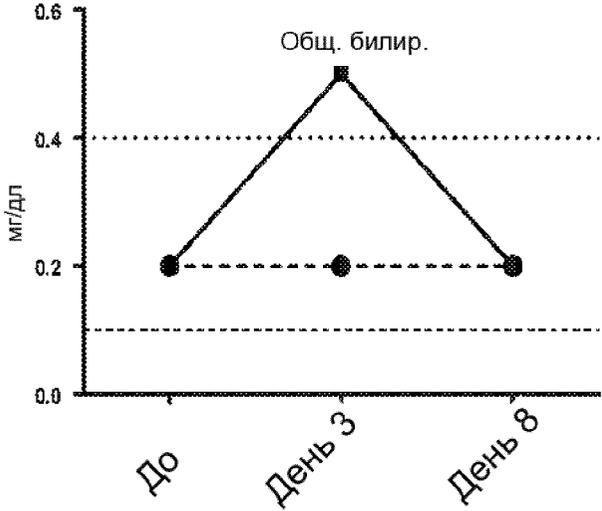


Антигела, активируемые антигела, биспецифические антигела и биспецифические активируемые антигела и способы их применения

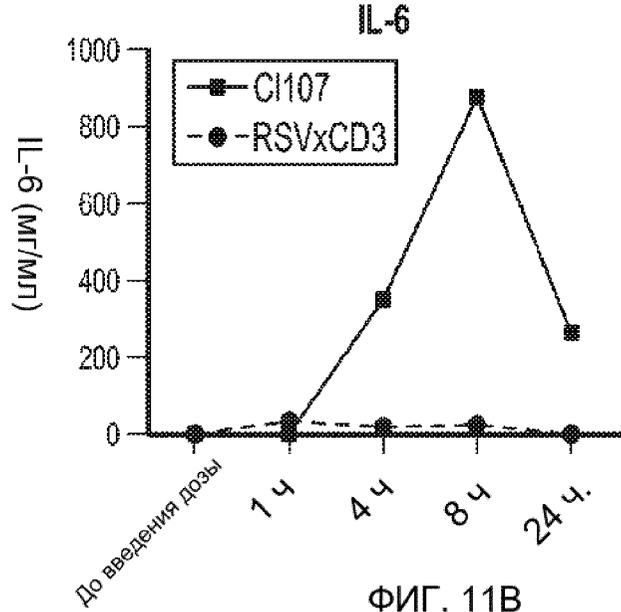
ФИГ. 10D-E



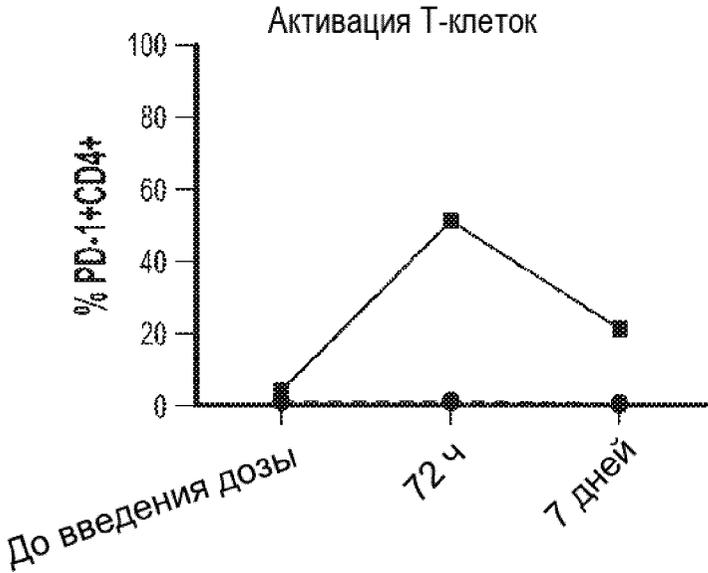
Антигена, активируемые антигена, биспецифические антигена
и биспецифические активируемые антигена и способы их применения



ФИГ. 11А

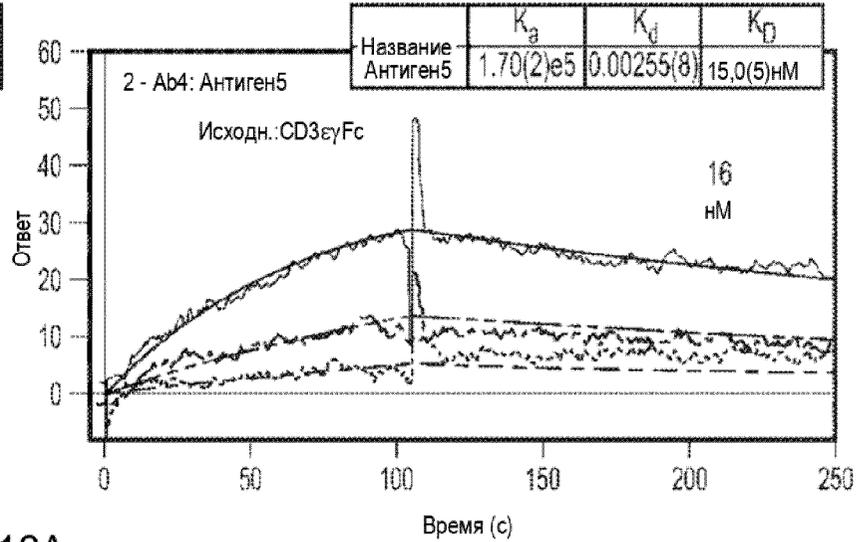
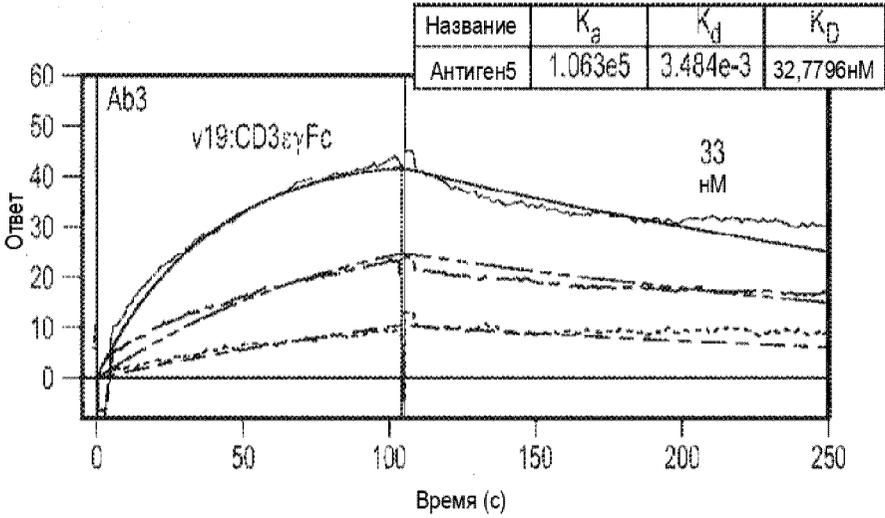
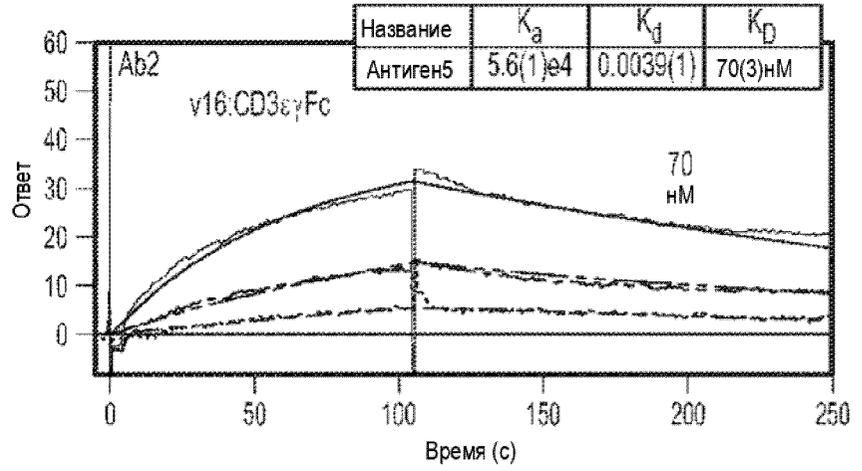
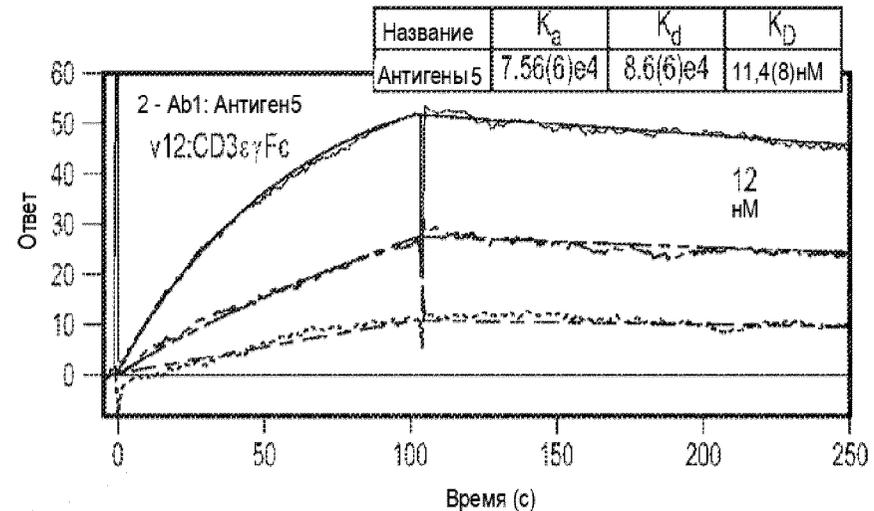


ФИГ. 11В

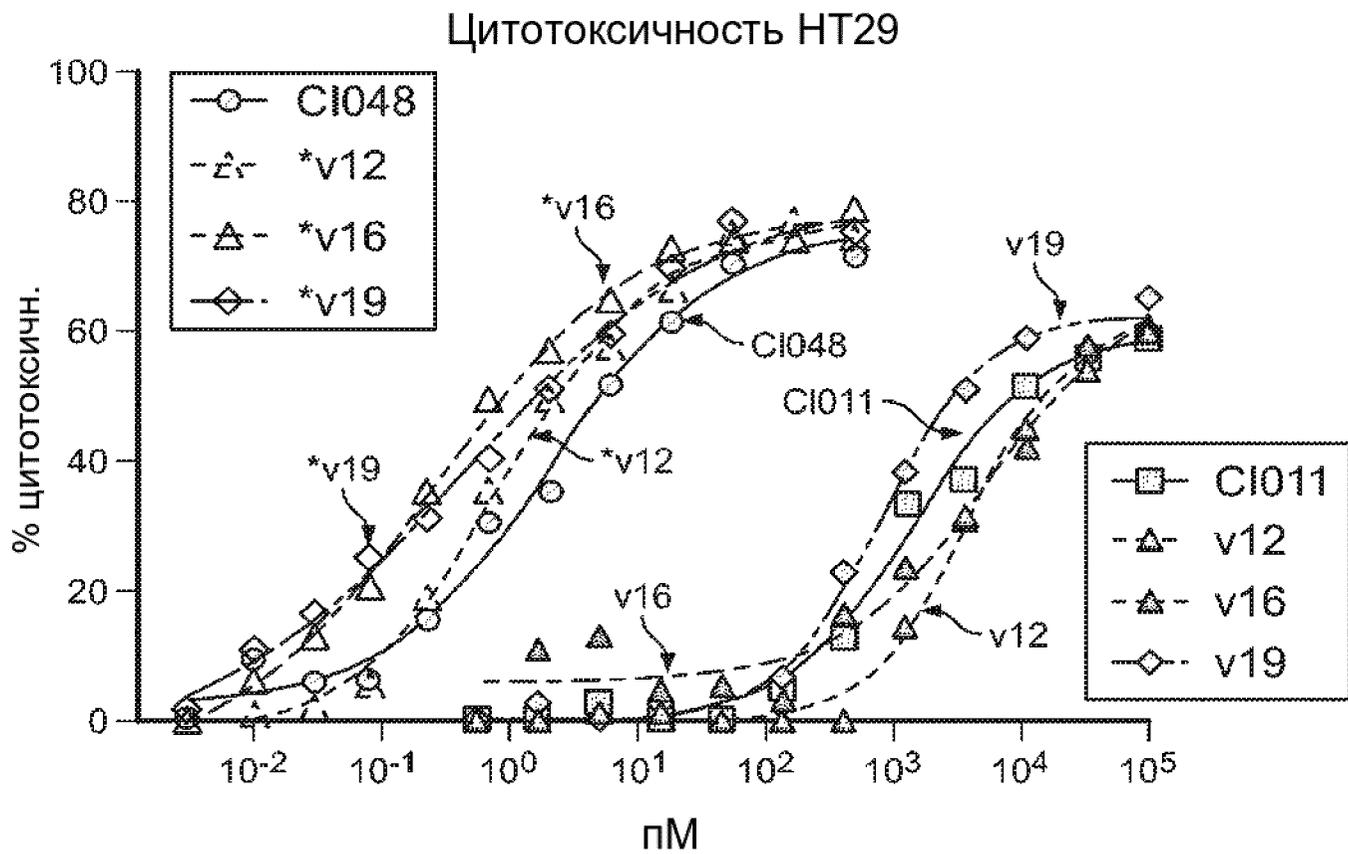


ФИГ. 11С

Антигела, активируемые антигела, биспецифические антигела и биспецифические активируемые антигела и способы их применения



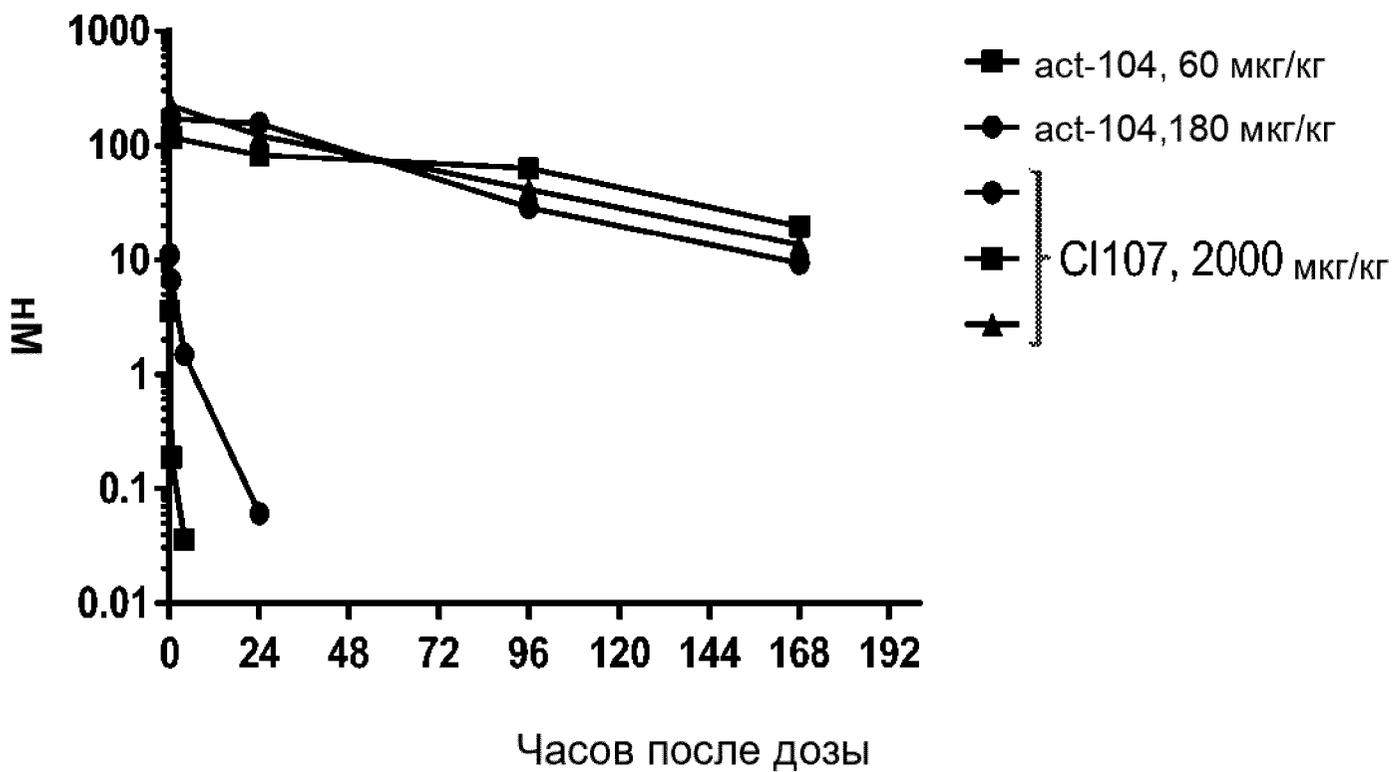
ФИГ. 12А



ФИГ.12В

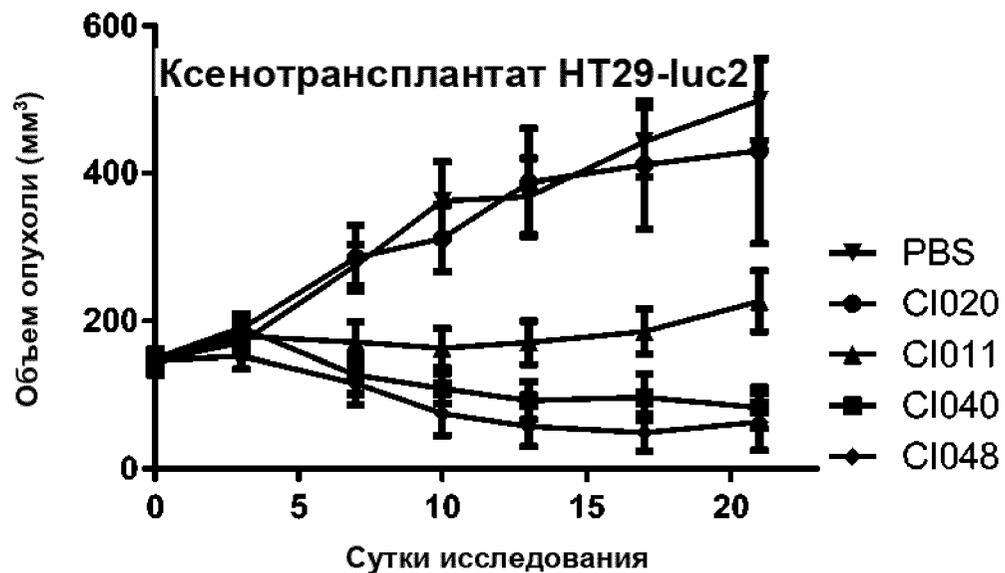
Конц. в плазме

ФИГ. 13

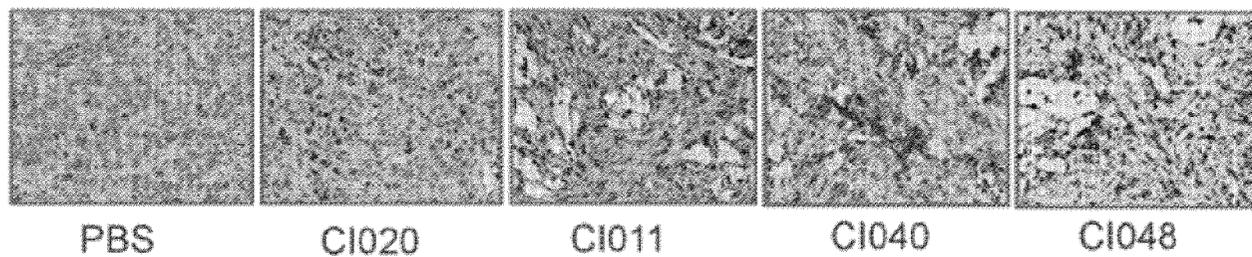


ФИГ. 14А-14В

(14А)

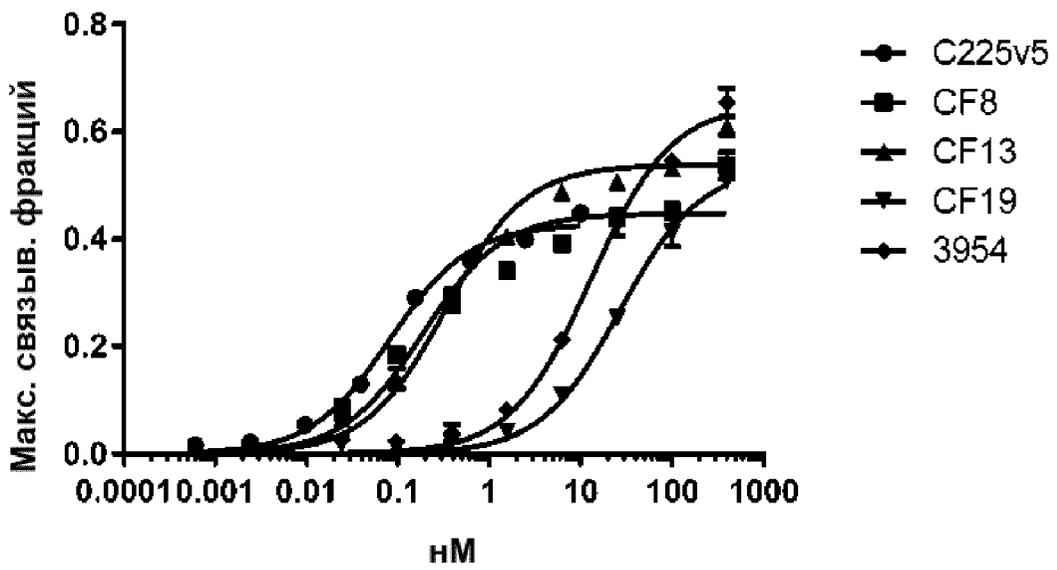


(14В)



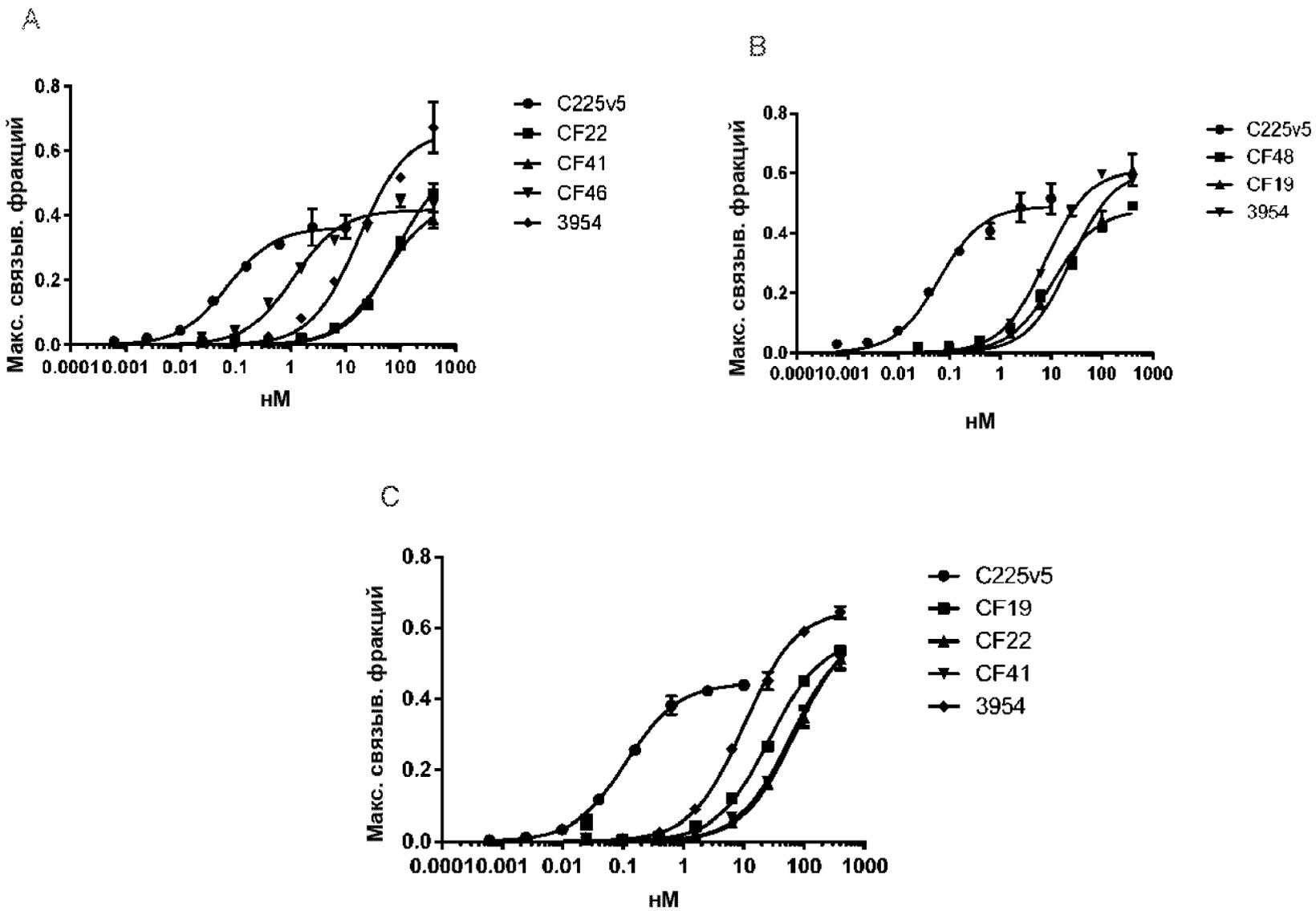
Увел. 20X

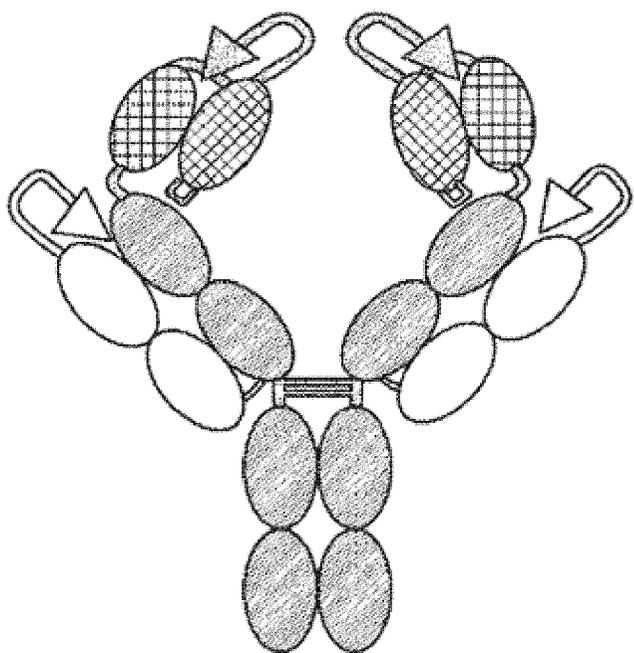
Антитела, активируемые антитела, биспецифические антитела
и биспецифические активируемые антитела и способы их применения



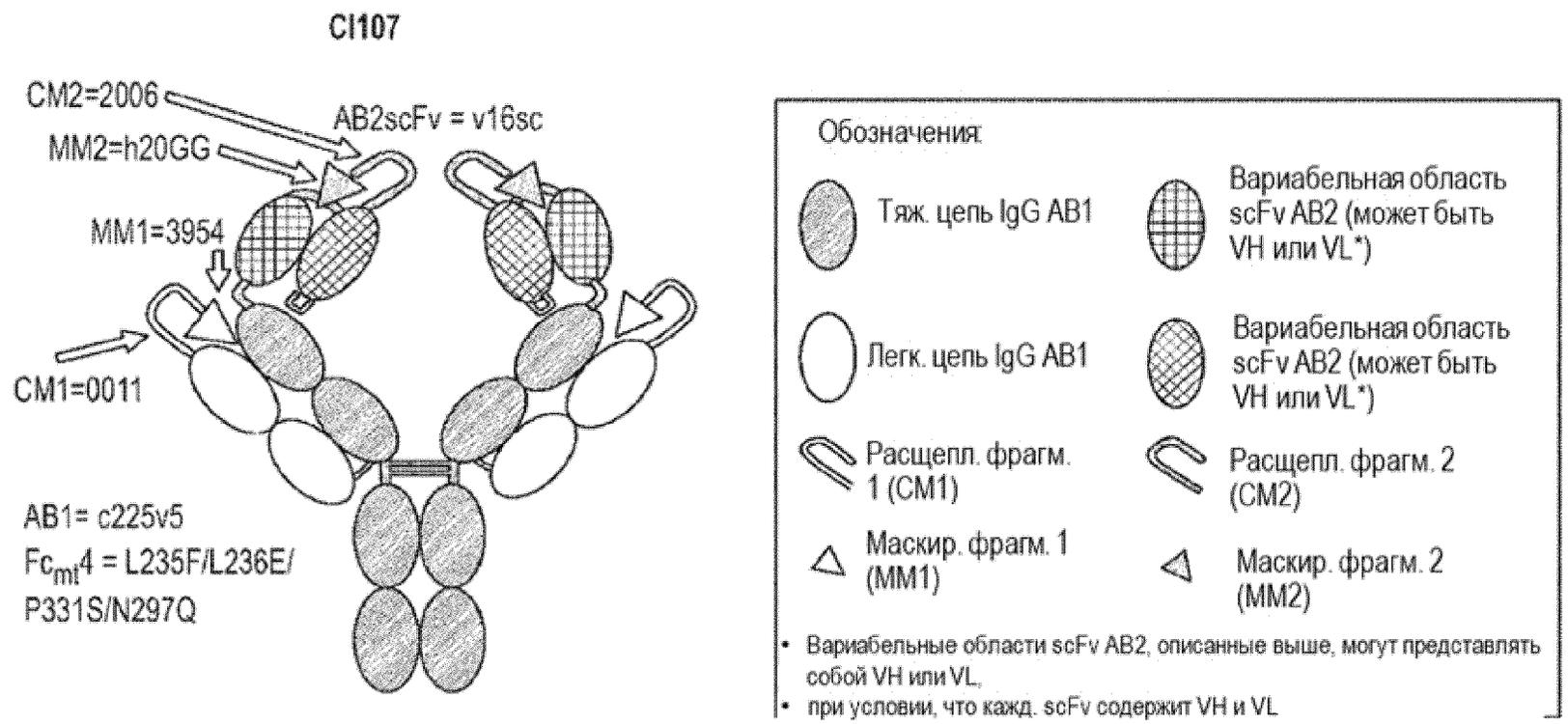
ФИГ. 15

ФИГ. 16

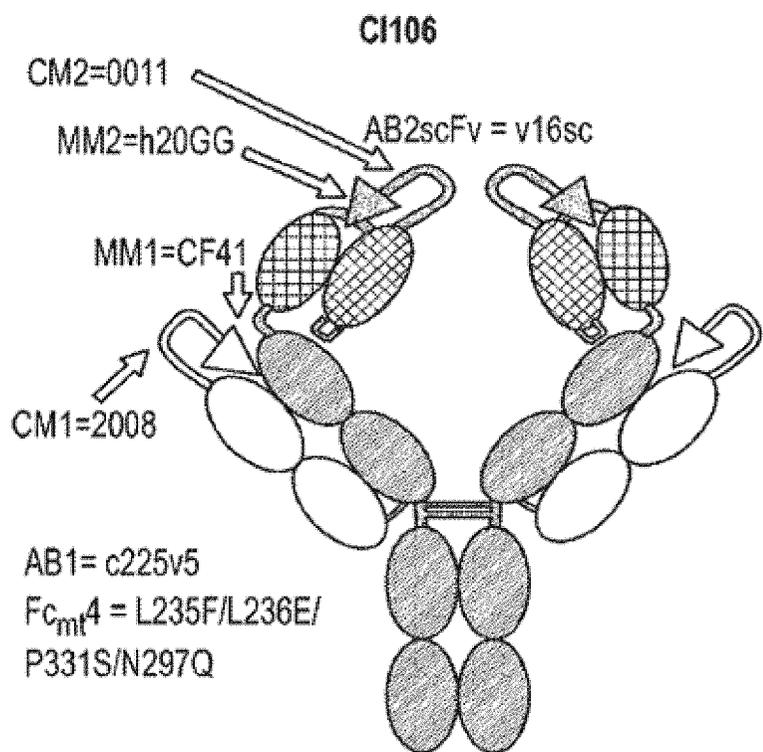




ФИГ. 17



ФИГ. 18

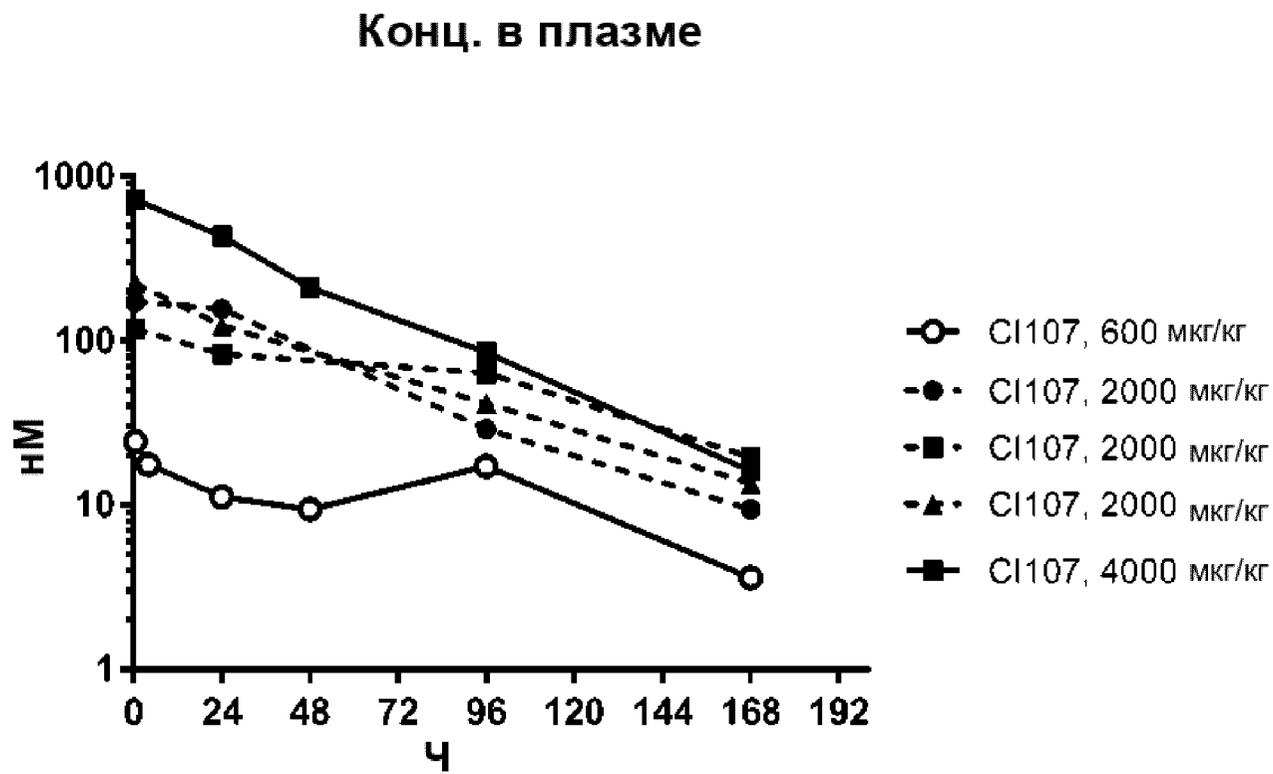


ФИГ. 19

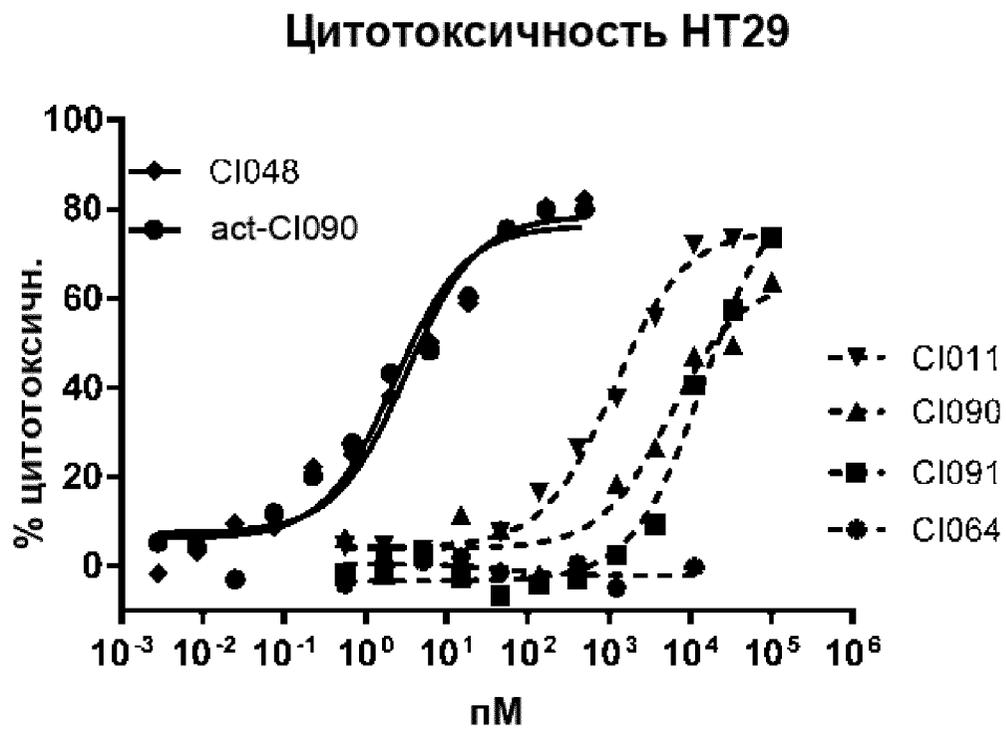
| Обозначени | |
|------------|---|
| | Тяж. цепь IgG AB1 |
| | Легк. цепь IgG AB1 |
| | Расщепл. фрагм. 1 (CM1) |
| | Расщепл. фрагм. 2 (CM2) |
| | Маскир. фрагм. 1 (MM1) |
| | Маскир. фрагм. 2 (MM2) |
| | Вариабельная область scFv AB2 (может быть VH или VL*) |
| | Вариабельная область scFv AB2 (может быть VH или VL*) |

- Вариабельные области scFv AB2, описанные выше, могут представлять собой VH или VL,
- при условии, что кажд. scFv содержит VH и VL

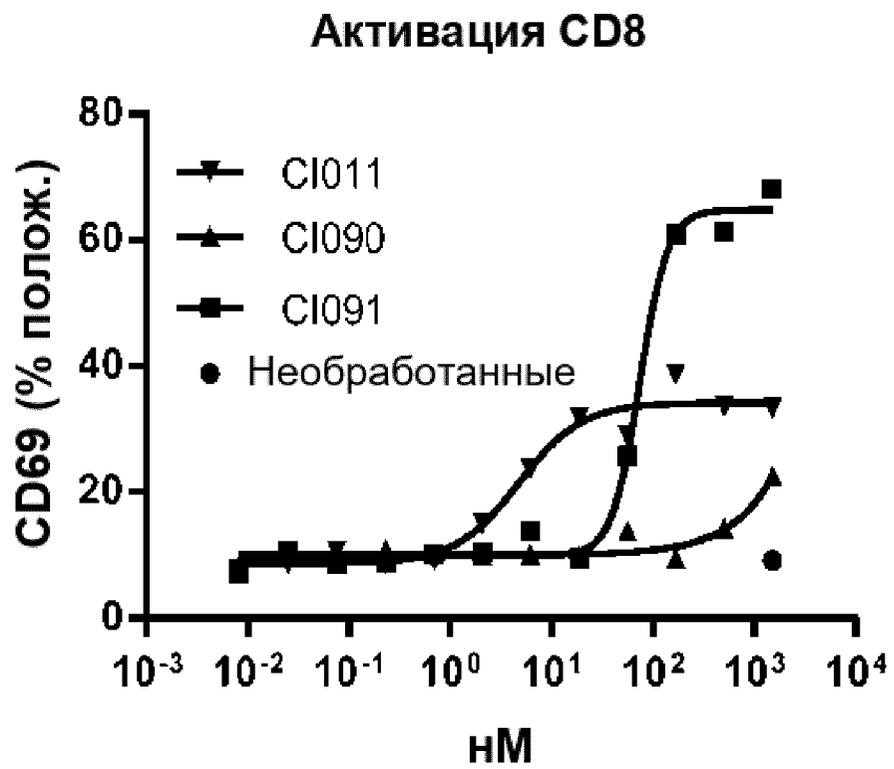
ФИГ. 20



ФИГ. 21



ФИГ. 22



ФИГ. 23



ФИГ. 24

