

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038329**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.10

(21) Номер заявки
201890294

(22) Дата подачи заявки
2016.08.26

(51) Int. Cl. **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЙ ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС И СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/211,532; 62/263,319; 62/278,755;
62/338,285; 62/363,046; 62/379,673

(32) 2015.08.28; 2015.12.04; 2016.01.14;
2016.05.18; 2016.07.15; 2016.08.25

(33) US

(43) 2018.07.31

(86) PCT/US2016/049137

(87) WO 2017/040344 2017.03.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АМЬЮНИКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Шелленбергер Фолькер, Ян Фань,
Тайер Дезире, Сим Би-Чэн, Ван Цзя-
Вэй (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) WO-A2-2014011819
WO-A2-2015023891

CLELAND et al., "A novel long-acting human growth hormone fusion protein (VRS-317): enhanced in vivo potency and half-life", J. Pharm. Sci., vol. 101, No 8, p. 2744-2754, Epub 07 June 2012, entire document

DING et al., "Multivalent Antiviral XTEN-Peptide Conjugates with Long in Vivo Half-Life and Enhanced Solubility", Bioconjugate Chemistry, vol. 25, No 7, p. 1351-1359, epub 23 June 2014, entire document

PODUST et al., "Extension of in vivo half-life of biologically active peptides via chemical conjugation to XTEN protein polymer", Protein. Eng. Des. Sel., vol. 26, No 11, p. 743-753, Epub 16 October 2013, entire document

(57) Изобретение относится к биспецифичным композициям химерного полипептидного комплекса, содержащим объемные группировки, присоединенные к связывающим доменам через расщепляемые отделяемые сегменты, которые, в случае выполнения расщепления, способны одновременно опосредовать связывание эффекторных Т-клеток с опухолевыми или раковыми клетками-мишенями и осуществление цитолиза опухолевых клеток или раковых клеток. Согласно изобретению также предложены композиции и способы получения и применения расщепляемых композиций химерного полипептидного комплекса.

B1**038329****038329****B1**

Предшествующий уровень техники

Многие одобренные к применению противораковые терапевтические средства представляют собой цитотоксические лекарственные средства, которые наряду с опухолевыми клетками уничтожают и нормальные клетки. Терапевтическая польза от этих цитотоксических лекарственных средств зависит от того, будут ли опухолевые клетки обладать большей восприимчивостью к ним по сравнению с нормальными клетками, благодаря чему будет обеспечиваться получение клинических ответов при использовании доз, не приводящих к неприемлемым побочным эффектам. Однако по существу все эти неспецифические лекарственные средства вызывают некоторое, в иных случаях серьезное повреждение нормальных тканей, что зачастую ограничивает пригодность в отношении лечения.

Применение биспецифичных антител предполагает другой подход к разработке цитотоксических лекарственных средств, согласно которому они направляют эффекторные клетки иммунной системы на уничтожение раковых клеток. В биспецифичных антителах объединены преимущества разных специфичностей связывания, обусловленных нахождением двух моноклональных антител в единой композиции, что обеспечивает осуществление подходов или получение комбинаций вариантов, которые невозможны при использовании моноспецифичных антител. В основе этого подхода лежит связывание одного плеча биспецифичного антитела с опухолеассоциированным антигеном или маркером, в то время как другое плечо, после связывания с молекулой CD3 (кластер дифференцировки 3) на Т-клетках, участвует в "запуске" их цитотоксической активности путем высвобождения эффекторных молекул, таких как TNF- α (альфа-фактор некроза опухоли), IFN- γ (интерферон-гамма), интерлейкины 2, 4 и 10, перфорин и гранзимы. Успехи в инженерии антител привели к разработке целого ряда форматов и композиций биспецифичных антител для перенаправления эффекторных клеток на мишени опухолей, включая биспецифичные Т-клеточные активаторы (BiTE®), такие как блинатумаб. BiTE функционируют посредством рекрутинга и активации поликлональных популяций Т-клеток в местах локализации опухолей и осуществляют это без необходимости в костимуляции или традиционном распознавании МНС (главный комплекс гистосовместимости). Тем не менее, остаются двойственные проблемы у некоторых пациентов, испытывающих серьезные побочные эффекты, называемые как "цитокиновый шторм" или "синдром высвобождения цитокинов" (Lee D.W. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. Blood, 2014, 124(2): 188-195), опосредуемые высвобождением TNF- α и IFN- γ , среди других цитокинов, помимо того факта, что композиции на основе BiTE имеют очень короткий период полувыведения, что обуславливает необходимость непрерывных инфузий в течение от четырех до восьми недель с целью поддержания содержания BiTE в пределах терапевтического окна в продолжение промежутка времени, достаточного для достижения терапевтического эффекта.

Сущность изобретения

Сохраняется существенная потребность в альтернативных терапевтических средствах, которые предусматривают фармакологические преимущества таких форматов на основе биспецифичных антител и одновременно характеризуются улучшенной безопасностью, сниженными побочными эффектами, более высокой селективностью и/или улучшенными фармакокинетическими свойствами, как например, необходимость в менее частом введении или во введении только путем однократной инъекции.

В настоящем изобретении раскрыт химерный полипептидный комплекс, полезный в лечении или предупреждении заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, раковые заболевания, аутоиммунные и воспалительные нарушения. Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен расщепляемый химерный полипептидный комплекс. Расщепляемые композиции химерного полипептидного комплекса направлены на удовлетворение потребности в таких препаратах и при своем применении превосходят традиционные препараты на основе биспецифичных антител в одном или более аспектах, включая увеличенный период полувыведения в конечной фазе, направленную доставку и сниженную токсичность в отношении здоровых тканей.

Заявленный полипептидный комплекс обычно содержит первую часть, вторую часть и третью часть, при этом: указанная первая часть содержит (1) первый связывающий домен со специфичностью связывания с маркером клетки-мишени; и (2) второй связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки; указанная вторая часть содержит пептидный отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться одной или несколькими протеазами млекопитающих; и указанная третья часть содержит объемную группировку; при этом указанная объемная группировка способна отделяться от указанной первой части под действием указанной протеазы млекопитающих на указанную вторую часть.

Порядок компоновки различных компонентов в заявленном химерном полипептидном комплексе может быть разным. В одном из воплощений химерный полипептидный комплекс скомпонован от N-конца к С-концу, при этом первая часть присоединена ко второй части, которая в свою очередь присоединена к третьей части. В другом воплощении химерный полипептидный комплекс скомпонован от N-конца к С-концу, при этом третья часть присоединена ко второй части, которая в свою очередь присоединена к первой части. В одном из воплощений химерный полипептидный комплекс представляет собой слитый белок. В другом воплощении вторая и третья части представляют собой слитый белок, и первая

часть конъюгирована со второй частью. В одном из воплощений композиции химически конъюгированного полипептидного комплекса С-конец полипептида первой части может быть конъюгирован с N-концом полипептида второй части через остаток цистеина или других подходящих аминокислот, пригодных для перекрестного сшивания с применением таких агентов, как малеимид, или других перекрестно сшивающих агентов, известных в данной области техники. В другом воплощении первая часть и вторая часть представляет собой мономерный слитый белок, а третья часть химически конъюгирована со второй частью.

Возможно, что композиции химерного полипептидного комплекса могут содержать дополнительную объемную группировку, присоединенную к данной композиции посредством второго отделяемого сегмента, присоединенного к противоположному концу этой композиции, тем самым окружающую первую и вторую части.

Первым и вторым связывающими доменами обычно являются фрагменты антител, происходящие из моноклональных антител. В одном из воплощений первый и второй связывающие домены первой части композиций химерного полипептидного комплекса представляют собой scFv (одноцепочечный Fv) или скомпонованы в виде диатела. В других воплощениях первый и второй связывающие домены первой части композиций химерного полипептидного комплекса выбраны из группы, состоящей из Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, линейных антител, однодоменного антитела, "неантительного" каркаса и однодоменного верблужьего антитела. В других воплощениях первый и второй связывающие домены первой части композиций химерного полипептидного комплекса выбраны из группы пептидов, "неантительных" каркасов, таких как антикаины, аднектины, финомеры, аффилины, аффитела, центирины, DARPIn (сконструированные белки с анкириновыми повторами). В других воплощениях связывающим доменом для опухолевой клетки-мишени является вариабельный домен Т-клеточного рецептора, который был сконструирован для связывания с МНС, несущим пептидный фрагмент белка, который сверхэкспрессируется опухолевыми клетками.

В одном из воплощений химерного полипептидного комплекса первый связывающий домен первой части обладает аффинностью связывания с маркером клетки-мишени. Клетки-мишени включают эукариотические клетки любых типов, как например, клетки, происходящие из эктодермы, мезодермы или энтодермы. Особый интерес представляют опухолевые клетки и маркеры, экспрессируемые опухолевыми клетками. Опухолевая клетка может происходить из клетки, выбранной из группы, состоящей из стромальной клетки, фибробластов, миофибробластов, глиальных клеток, эпителиальных клеток, липоцитов, лимфоцитарных клеток, клеток сосудов, гладкомышечных клеток, мезенхимальных клеток, клеток ткани молочной железы, клеток предстательной железы, клеток почки, клеток головного мозга, клеток толстой кишки, клеток яичников, клеток матки, клеток мочевого пузыря, клеток кожи, клеток желудка, клеток мочеполовых путей, клеток шейки матки, клеток тонкого кишечника, клеток печени, панкреатических клеток, клеток желчного пузыря, клеток желчных протоков, клеток пищевода, клеток слюнных желез, клеток легкого и клеток щитовидной железы. В некоторых случаях опухолеспецифический маркер включает альфа-4-интегрин, Ang2 (ангиопоэтин 2), B7-H3 (гомолог 3 семейства B7), B7-H6 (гомолог 6 семейства B7), CEACAM5 (родственная карциноэмбриональному антигену молекула 5 клеточной адгезии, cMET, CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4), FOLR1 (рецептор 1 фолиевой кислоты), EpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), CCR5 (хемокиновый рецептор 5 семейства CC), CD19, HER2 (рецептор эпидермального фактора роста 2 типа у людей), HER2 neu (HER2 у грызунов), HER3, HER4, HER1 (EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)), PD-L1 (лиганд 1 белка программируемой (клеточной) смерти), PSMA (мембранный антиген предстательной железы), CEA (карциноэмбриональный антиген), MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG (хорионический гонадотропин-бета человека), антиген Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM (молекула адгезии нервных клеток)), CD133, ганглиозид GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразу IX, CD44v6, продукт гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антиген 1 плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликан меланомы (MCSP), CCR8, антиген эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелин, антиген A33, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеин 4, фетальный никотиновый ацетилхолиновый рецептор (fnAChR), CD25, раковый антиген 19-9 (CA19-9), раковый антиген 125 (CA-125), рецептор II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIIR), стапированный антиген Tn (sTN), антиген - белок активации фибробластов (FAP), эндосиалин (CD248), вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированный антиген L6 (TAL6), SAS (поверхностный белок *Staphylococcus aureus*), CD63, TAG72 (опухолеассоциированный гликопротеин 72), антиген Томсена-Фриденрайха (антиген TF), рецептор инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антиген Ccrp, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP (матриксные металлопротеиназы мембранного типа), антиген F19, альфафетопротеин (AFP), VEGFR1 (рецептор 1 сосудистого эндотелиального фактора роста), VEGFR2 (рецептор 2 сосудистого эндотелиального фактора роста), DLK1, SP17, ROR1 (родственный рецептору ретиноевой кислоты орфановый рецептор 1) и EphA2 (рецептор эфрина A2). В другом воплощении химерного полипептидного комплекса первый связывающий домен первой части обладает аффинностью связывания с маркером клетки-мишени, представляющим собой маркер воспаления.

В одном из воплощений первый связывающий домен первой части композиций химерного полипептидного комплекса содержит переменные области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей, обладающие аффинностью специфического связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени. В одном из упомянутых выше воплощений VH и VL первого связывающего домена происходят из VH и VL моноклонального антитела, выбранных из группы парных последовательностей, приведенных в табл. 2. Порядок компоновки VH- и VL-областей первого и второго связывающих доменов, применительно к порядку от N-конца к С-концу, может быть разным. В одном из воплощений VH- и VL-области первого связывающего домена располагаются в порядке VH-VL. В другом воплощении VH- и VL-области первого связывающего домена располагаются в порядке VL-VH. В других случаях первый связывающий домен содержит участок CDR-H1 (определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи), участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, при этом каждый из указанных участков происходит из последовательностей моноклонального антитела, выбранных из группы последовательностей, приведенных в табл. 2. Различные конфигурации VH- и VL-областей, а также CDR, содержащихся в них, обычно сохраняют желаемую специфичность связывания с предполагаемым маркером клетки-мишени.

В других воплощениях химерного полипептидного комплекса второй связывающий домен первой части обладает аффинностью связывания с эффекторной клеткой. Там, где это желательно, эффекторной клеткой могут быть иммунные клетки, включая, но не ограничиваясь этим, плазматическую клетку, Т-клетку, В-клетку, цитокин-индуцируемую киллерную клетку (CIC клетку), тучную клетку, дендритную клетку, регуляторную Т-клетку (RegT-клетку), хелперную Т-клетку, миелоидную клетку и природную киллерную (NK) клетку. Второй связывающий домен обычно демонстрирует специфичность связывания с антигеном, экспрессируемым эффекторной клеткой. В некоторых воплощениях антиген экспрессируется на поверхности эффекторной клетки. В другом воплощении второй связывающий домен обладает специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки, экспрессированным на Т-клетке. Неограничивающие типичные антигены эффекторных клеток включают CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ T-TCR (Т-клеточный рецептор), CD25, CD45RO, CD69, CD127 и CD196 (CCR6). Особый интерес представляет второй связывающий домен в конфигурации scFv, имеющего VH- и VL-области, происходящие из моноклонального антитела, которое специфично связывается с CD3 человека. В одном из воплощений VH и VL второго связывающего домена происходят из VH и VL моноклонального антитела, выбранных из группы последовательностей, приведенных в табл. 1. В другом воплощении второй связывающий домен содержит VH- и VL-области, происходящие из моноклонального антитела, способного связываться с CD3ε человека.

VH и VL scF в связывающих доменах могут быть расположены в разных конфигурациях без влияния на применимость полученной композиции. В одном из воплощений, второй связывающий домен scFv содержит VH- и VL-области, расположенные в порядке VH-VL или VL-VH в направлении от N-конца к С-концу. Связывающие домены также могут быть созданы из CDR участков. В одном из воплощений второй связывающий домен содержит участок CDR-H1, участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, при этом каждый из них происходит из моноклонального антитела из табл. 1. В упомянутых выше в данном абзаце воплощениях, VH- и VL-области, а также первый связывающий домен и второй связывающий домен соединены гибкими полипептидными линкерами, выбранными из группы последовательностей, приведенных в табл. 8 и 9. В другом воплощении первая часть композиций химерного полипептидного комплекса имеет последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей табл. 13.

Одно из преимуществ заявленного химерного полипептидного комплекса заключается в том, что он собран в форме пролекарства, при этом интактная композиция может быть активирована вблизи ткани-мишени или в определенном клеточном окружении, в котором присутствуют протеазы млекопитающих, с высвобождением связывающих доменов первой части в том месте, где их активность представляется наиболее желательной. Например, связывающий домен первой части, в случае его присутствия в интактной форме комплекса, имеет более низкую аффинность связывания вследствие экранирующего эффекта объемной группировки. В результате высвобождения посредством расщепления RS протеазой млекопитающих, предпочтительно экспрессируемой в ткани-мишени, например, в опухолевой ткани, связывающий домен первой части становится "активированным" без экранирования его объемной группировкой. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом протеаза млекопитающих, способная к расщеплению RS, предпочтительно экспрессирована в воспалительной ткани. В одном из воплощений химерный полипептидный комплекс включает в себя RS, при этом RS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 4. Там, где это желательно, RS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LSGRSDNHSPLGLAGS, SPLGLAGSLSGRSDNH, SPLGLSGRSDNH, LAGRSDNHSPLGLAGS, LSGRSDNHVPLSLKMG, SPLGLAGS, GPLALARG, LSGRSDNH, VPLSLTMG, VPLSLKMG, VPLSLSMG, EPLELVAG,

EPLELRAG, EPAALMAG, EPASLMAG, RIGSLRTA, RIQFLRTA, EPFHLMAG, VPLSLFMG, EPLELPAG и EPLELAAG. Там, где это желательно, отделяемый сегмент композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNHSPLGLAGS. В воплощениях, включающих в себя RS, RS содержит аминокислотную последовательность, способную расщепляться одной или несколькими протеазами, выбранными из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл. 3.

Согласно другому аспекту третья часть композиции химерного полипептидного комплекса содержит объемную группировку. Типичные объемные группировки включают, но не ограничиваются этим: удлиненные рекомбинантные полипептиды (XTEN), альбумин-связывающий домен, альбумин, IgG-связывающий домен, полипептиды, состоящие из пролина, серина и аланина; жирную кислоту, биополимер ELP (эластиноподобный белок), Fc домен, полиэтиленгликоль (ПЭГ), PLGA (сополимер молочной и гликолевой кислот) и гидроксиэтилкрахмал. В одном из воплощений объемная группировка представляет собой последовательность XTEN. Там, где это желательно, XTEN третьей части содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5.

Согласно другому аспекту, заявленный химерный полипептидный комплекс демонстрирует способность связывать и соединять эффекторные клетки и клетки-мишени с образованием тем самым иммунологического синапса, благодаря чему эффекторная клетка может опосредовать свой биологический эффект в клетке-мишени специфичным образом. Например, заявленный химерный полипептидный комплекс обладает способностью (1) специфично связываться с маркером клетки-мишени, таким как опухолеспецифический маркер, и (2) специфично связываться с антигеном, экспрессированным на эффекторной клетке (например, антигеном, экспрессированным Т-клеткой). Одновременное связывание с Т-клеткой и опухолевой клеткой опосредует цитотоксичность, повреждение и/или лизис опухолевой клетки. В одном из воплощений, в результате расщепления второй части под действием одной или более протеаз млекопитающих и высвобождения первой части первая часть приобретает способность одновременно связываться с Т-клеткой, несущей антиген CD3 человека, и с опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер, как показано в анализе *in vitro* с применением как Т-клеток, так и опухолевых клеток. В соответствии с типичной особенностью строения композиций по изобретению, в результате расщепления RS во второй части с целью высвобождения первой части и третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса, высвободившаяся первая часть имеет молекулярную массу, по меньшей мере в 2, 3, 4 или 5 раз меньше, чем у третьей части, и имеет молекулярную массу, по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60% меньше, чем у интактного химерного полипептидного комплекса. В одном из воплощений, в результате расщепления RS во второй части указанная первая часть, высвободившаяся из указанного химерного полипептидного комплекса, имеет более высокую аффинность связывания с эффекторной Т-клеткой, несущей антиген CD3, и/или с маркером опухолевых клеток, по сравнению с химерным связывающим комплексом, в случае, когда вторая часть не была расщеплена. Более высокая аффинность связывания высвободившейся первой части с Т-клеткой, несущей антиген CD3 человека, и/или маркером опухолевых клеток по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или в 10 раз превышает аффинность связывания химерного полипептидного комплекса с Т-клеткой, несущей антиген CD3 человека, или с маркером опухолевых клеток, в случае, когда RS не был расщеплен. В другом воплощении в результате расщепления RS во второй части и высвобождения указанной первой части из указанного химерного полипептидного комплекса и благодаря одновременному связыванию первой части с Т-клеткой и опухолевой клеткой проявляется цитотоксическая активность в отношении опухолевой клетки в анализе *in vitro* с применением популяции Т-клеток и опухолевых клеток. В другом воплощении высвободившаяся первая часть химерного полипептидного комплекса способна осуществлять воздействие на опухолевую клетку, выражаемое в большем количестве лизируемых клеток, по сравнению с воздействием интактного химерного связывающего комплекса в анализе *in vitro*. Например, количество лизируемых клеток, образуемых посредством высвободившейся первой части химерного полипептидного комплекса, по меньшей мере в 10 раз больше, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 300 раз, или по меньшей мере в 1000 раз больше по сравнению с интактным химерным связывающим комплексом в анализе *in vitro*. В одном из воплощений цитотоксическая активность и/или лизис опухолевой клетки опосредован специфично направленной активацией Т-клетки, при этом количество активированных Т-клеток, образуемых посредством высвободившейся первой части химерного полипептидного комплекса по меньшей мере в 10 раз больше, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 300 раз, или по меньшей мере в 1000 раз больше по сравнению с интактным химерным связывающим комплексом. Поскольку RS в химерном связывающем комплексе может подвергаться частичному расщеплению при выполнении анализа цитотоксического действия *in vitro* с целью определения максимальной разницы сравниваемых величин в отношении цитотоксичности, то RS в таком комплексе можно заменить на нерасщепляемый пептид и проанализировать в сравнении с образом высвободившейся первой части. Там, где это желательно, анализ *in vitro* может представлять собой анализы, выбранные из анализа целостности клеточной мембраны, анализа в сме-

шанной культуре клеток, метода сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), основанного на анализе иодида пропидия, анализа проникновения трипанового синего, фотометрического анализа высвобождения ферментов, радиометрического анализа высвобождения ^{51}Cr , флуориметрического анализа высвобождения европия, анализа высвобождения кальцеина АМ (ацетоксиметилкальцеина), фотометрического анализа содержания МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид), анализа содержания ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанид), анализа содержания WST-1 (водорастворимая тетразолиевая соль-1), анализа с использованием аламарового синего, радиометрического анализа встраивания ^3H -Thd (тимидин), оценки клоногенности с измерением активности в отношении деления клеток, флуориметрического анализа содержания родамина-123 с измерением трансмембранного градиента в митохондриальной мембране, анализа апоптоза с мониторингом экспонирования фосфатидилсерина посредством FACS, анализа с использованием теста TUNEL (ник-концевое мечение дезоксиридинтрифосфатом(дУТФ)-биотином, опосредованное терминальной дезоксинуклеотидил-трансферазой (TdT)), основанного на ELISA (иммуноферментный твердофазный анализ), сэндвич-ELISA, анализа каспазной активности, анализа высвобождения LDH (лактатдегидрогеназа) с применением клеток и морфологического анализа клеток или любой их комбинации, или выполнены методами, изложенными в данном описании ниже в разделе примеры.

Согласно другому аспекту изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие первую часть, при этом указанная первая часть содержит 1) второй связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки; и 2) первый связывающий домен со специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени; вторую часть, при этом указанная вторая часть содержит первый отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться под действием протеазы млекопитающих; третью часть, содержащую первую объемную группировку, при этом указанная объемная группировка способна отделяться от указанной первой части под действием указанной протеазы млекопитающих на указанную вторую часть; четвертую часть, содержащую отделяемый сегмент (RS), который может быть таким же, что и RS во второй части, или может отличаться от него, и пятую часть, содержащую вторую объемную группировку, которая может быть такой же, как и для третьей части или может отличаться от нее, при этом указанная объемная группировка способна отделяться от указанной первой части под действием указанной протеазы млекопитающих на указанную четвертую часть. В одном из упомянутых выше воплощений второй отделяемый сегмент композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 4. В еще одном из упомянутых выше воплощений второй отделяемый сегмент композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей LSGRSDNHSPLGLAGS, SPLGLAGSLSGRSDNH, SPLGLSGRSDNH, LAGRSDNHSPLGLAGS, LSGRSDNHVPLSLKMG, SPLGLAGS, GPLALARG, LSGRSDNH, VPLSLTMG, VPLSLKMG, VPLSLSMG, EPLELVAG, EPLELRAG, EPAALMAG, EPASLMAG, RIGSLRTA, RIQFLRTA, EPFHLMAG, VPLSLFMG, EPLELPAG и EPLELAAG. В еще одном из упомянутых выше воплощений второй отделяемый сегмент композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, способную расщепляться под действием протеазы, выбранной из группы протеаз, приведенных в табл. 3. В еще одном из упомянутых выше воплощений объемная группировка пятой части композиции выбрана из группы, состоящей из: XTEN; альбумин-связывающего домена; альбумина; IgG-связывающего домена; полипептида, содержащего по меньшей мере 350 аминокислотных остатков, состоящего из пролина, серина и аланина; жирной кислоты и Fc домена. В еще одном из упомянутых выше воплощений объемная группировка пятой части композиции представляет собой XTEN. В еще одном из упомянутых выше воплощений объемная группировка композиции представляет собой XTEN, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности, в случае оптимального выравнивания, с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью без сигнального пептида, которая приведена в табл. 10, в случае оптимального выравнивания. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, которая приведена в табл. 12, в случае оптимального выравнивания. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, которая приведена на фиг. 36 или 37. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей полипептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных на фиг. 36 или 37.

Среди типичных характеристик композиций химерного полипептидного комплекса способность оказывать влияние на цитотоксичность клеток-мишеней после высвобождения связывающих доменов первой части (по сравнению с интактной композицией) сверхпропорциональна более высокой аффинности связывания высвободившейся первой части с маркером клетки-мишени по сравнению с аффинностью для интактной композиции. В одном из воплощений этой характеристики относительная цитотоксичность, выраженная в виде целого числа EC_{50} (концентрации, необходимой для достижения половины максимального биологического ответа активного вещества), по отношению к аффинности связывания, выраженной в виде $\log K_d$ (константа диссоциации), в анализе *in vitro* составляет по меньшей мере примерно 2:1, или по меньшей мере 10:1, или по меньшей мере 50:1, или по меньшей мере 100:1, или по меньшей мере 300:1, или по меньшей мере 500:1, или по меньшей мере 1000:1. В другом воплощении отношение цитотоксичности (например, выраженной в виде целого числа EC_{50}) к аффинности связывания (например, выраженной в виде $\log K_d$) высвободившейся первой части химерного полипептидного комплекса в анализе *in vitro* составляет по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 30 раз, по меньшей мере примерно в 50 раз, или по меньшей мере примерно в 100 раз более высокое значение.

В некоторых воплощениях, при сравнении а) относительной цитотоксичности, которую измеряют как соотношение между (1) цитотоксичностью высвободившейся первой части по отношению к опухолевой клетке-мишени анализе *in vitro* с применением как Т-клеток, так и опухолевых клеток, несущих маркер клетки-мишени, и (2) цитотоксичностью композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоединенную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот; и б) относительной аффинности связывания с антигеном эффекторной клетки, которую измеряют как соотношение между (1) аффинностью связывания высвободившейся первой части с антигеном эффекторной клетки и (2) аффинностью связывания с антигеном эффекторной клетки композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоединенную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот, соотношение между относительной цитотоксичностью и относительной аффинностью связывания превышает по меньшей мере 3:1, 10:1 или превышает по меньшей мере 30:1, или превышает по меньшей мере 50:1, или превышает по меньшей мере 100:1, или превышает по меньшей мере 300:1, или превышает по меньшей мере 500:1, или превышает по меньшей мере 1000:1. В одном из упомянутых выше воплощений нерасщепляемый пептид имеет последовательность глицин-серин, серин-глицин или представляет собой конструкции из многократно повторяющихся единиц того и другого дипептида, а антиген эффекторной клетки представляет собой CD3. В одном из воплощений, при сравнении а) относительной цитотоксичности, которую измеряют как соотношение между (1) цитотоксичностью высвободившейся первой части по отношению к опухолевой клетке-мишени в анализе *in vitro* с применением как Т-клеток, так и опухолевых клеток, несущих маркер клетки-мишени, и (2) цитотоксичностью композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоединенную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот; и б) относительной аффинности связывания с маркером клетки-мишени, которую измеряют как соотношение между (1) аффинностью связывания высвободившейся первой части с маркером клетки-мишени и (2) аффинностью связывания с маркером клетки-мишени композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоединенную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот, соотношение между относительной цитотоксичностью и относительной аффинностью связывания превышает по меньшей мере 3:1, 10:1 или превышает по меньшей мере 30:1, или превышает по меньшей мере 50:1, или превышает по меньшей мере 100:1, или превышает по меньшей мере 300:1, или превышает по меньшей мере 500:1, или превышает по меньшей мере 1000:1. В одном из упомянутых выше воплощений нерасщепляемый пептид имеет последовательность глицин-серин, серин-глицин или представляет собой конструкции из многократно повторяющихся единиц того и другого дипептида, а антиген эффекторной клетки представляет собой CD3. В другом воплощении, при сравнении а) относительной цитотоксичности, которую измеряют как соотношение между (1) цитотоксичностью высвободившейся первой части по отношению к опухолевой клетке-мишени в анализе *in vitro* с применением как Т-клеток, так и опухолевых клеток, несущих маркер клетки-мишени, и (2) цитотоксичностью композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоединенную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот; б) относительной аффинности связывания с антигеном эффекторной клетки, которую измеряют как соотношение между (1) аффинностью связывания высвободившейся первой части с антигеном эффекторной клетки и (2) аффинностью связывания композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоеди-

ненную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот; и в) относительной аффинности связывания с маркером клетки-мишени, которую измеряют как соотношение между (1) аффинностью связывания высвободившейся первой части с маркером клетки-мишени и (2) аффинностью связывания с маркером клетки-мишени композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, присоединенную посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот, соотношение между относительной цитотоксичностью и относительной аффинностью связывания эффекторной клетки с антигеном, умноженное на относительную аффинность связывания с маркером клетки-мишени, превышает по меньшей мере 3:1, 10:1 или превышает по меньшей мере 30:1, или превышает по меньшей мере 50:1, или превышает по меньшей мере 100:1, или превышает по меньшей мере 300:1, или превышает по меньшей мере 500:1, или превышает по меньшей мере 1000:1. В одном из упомянутых выше воплощений нерасщепляемый пептид имеет последовательность глицин-серин, серин-глицин или представляет собой конструкции из многократно повторяющихся единиц того и другого дипептида, а антиген эффекторной клетки представляет собой CD3. В одном из воплощений изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, при этом значение EC_{50} высвободившейся первой части композиции химерного полипептидного комплекса в анализе цитотоксичности *in vitro* с использованием как Т-клеток, так и опухолевых клеток, несущих маркер клетки-мишени, составляет 5000 пг/мл или меньше, еще более предпочтительно 1000 пг/мл или меньше, еще более предпочтительно 500 пг/мл или меньше, еще более предпочтительно 350 пг/мл или меньше, еще более предпочтительно 250 пг/мл или меньше, еще более предпочтительно меньше 100 пг/мл, еще более предпочтительно 50 пг/мл или меньше, еще более предпочтительно меньше 10 пг/мл и наиболее предпочтительно 5 пг/мл или меньше. В одном из воплощений значение EC_{50} высвободившейся первой части композиции химерного полипептидного комплекса в анализе *in vitro* меньше по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 120 раз значения EC_{50} для интактной композиции химерного полипептидного комплекса.

В некоторых случаях аффинность связывания первого связывающего домена высвободившейся первой части с опухолеспецифическим маркером выше по сравнению с аффинностью связывания второго связывающего домена высвободившейся первой части с антигеном CD3. В одном из воплощений величина аффинности связывания первого связывающего домена высвободившейся первой части с клеткой-мишенью, по результатам измерений константы K_d в анализе *in vitro*, по меньшей мере на один порядок выше по сравнению с аффинностью связывания второго связывающего домена с антигеном CD3. В других воплощениях аффинность связывания первого связывающего домена высвободившейся первой части с клеткой-мишенью, по результатам измерений константы K_d в анализе связывания *in vitro*, составляет от 10^{-5} до 10^{-9} М, и K_d для второго связывающего домена составляет от 10^{-5} до 10^{-9} М. Аффинность связывания может быть определена в стандартных анализах с применением клеток, ELISA, анализах, описанных в данном изобретении в разделе Примеры, или в других анализах *in vitro*, известных в данной области техники.

Согласно другому аспекту изобретение относится к улучшенным свойствам химерного полипептидного комплекса при введении субъекту. В частности, предполагается, что интактные композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие отделяемые сегменты, демонстрируют более низкую цитотоксичность и/или сниженную способность вызывать продуцирование провоспалительных цитокинов по сравнению с таким компонентом, как высвободившаяся первая часть. В одном из воплощений изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, при этом в результате или после введения композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, субъекту вторая часть комплекса расщепляется вблизи опухоли, экспрессирующей протеазу, способную расщеплять RS. В результате расщепления второй части под действием указанной протеазы млекопитающих и высвобождения первой части из комплекса первая часть приобретает способность одновременно связываться с Т-клеткой, несущей антиген CD3 человека, и с опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер, у субъекта. В одном из воплощений результатом одновременного связывания высвободившейся первой части с Т-клеткой, несущей антиген CD3, и опухолевой клеткой, несущей маркер опухолевых клеток, является высвобождение эффекторных молекул Т-клеток. В упомянутых выше воплощениях эффекторная молекула выбрана из одной или более чем одной эффекторной молекулы из группы, состоящей из TNF- α , IFN- γ , интерлейкина 2, перфорина и гранзимов или других эффекторных молекул Т-клеток, известных в данной области техники. Вследствие одновременного связывания с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью образуется иммунологический синапс, что обеспечивает лизис клетки-мишени под действием Т-клетки и эффекторных молекул.

Согласно другому аспекту изобретение относится к композициям химерного полипептидного комплекса с увеличенным периодом полувыведения в конечной фазе и другими свойствами, обеспечиваемыми присутствием объемной группировки, например, XTEN. В одном из воплощений изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, при этом интактная композиция демон-

стрирует период полувыведения в результате или после введения субъекту, превышающий по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз период полувыведения первой части, не соединенной с указанной второй и третьей частями, в результате или после введения субъекту в сопоставимой дозе. В другом воплощении, в результате или после введения химерного полипептидного комплекса субъекту, расщепления второй части и высвобождения указанной первой части и указанной третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса указанная первая часть имеет период полувыведения, по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз более низкий по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом, у субъекта. В схожем воплощении максимальная концентрация в плазме крови, $C_{\max}$, высвободившейся первой части в результате или после однократного введения композиции химерного полипептида субъекту не превышает примерно 0,01 нг/мл, или примерно 0,1 нг/мл, или примерно 1 нг/мл, или примерно 10 нг/мл, или примерно 100 нг/мл. В другом схожем воплощении максимальная концентрация в плазме крови, $C_{\max}$, высвободившейся первой части в результате или после однократного введения интактной композиции химерного полипептида субъекту по меньшей мере в 3 раза ниже, или по меньшей мере в 10 раз ниже, или по меньшей мере в 30 раз ниже, или по меньшей мере в 100 раз ниже максимальной концентрации в плазме крови, $C_{\max}$, интактного химерного полипептидного комплекса у того же субъекта. Фармакокинетические параметры можно измерить, используя образцы плазмы крови от субъекта с введенным заявленным химерным полипептидным комплексом, применяя методы, изложенные в данном описании, или традиционные методы, известные в данной области техники. В другом воплощении, для интактного химерного полипептидного комплекса, в результате или после введения субъекту, продемонстрирована более слабая экстравазация из кровеносной системы субъекта по сравнению с химерным полипептидным комплексом, в котором RS расщеплен с высвобождением первой части и третьей части. В упомянутых выше в этом абзаце воплощениях субъектом могут быть мышь, крыса, обезьяна, собака и человек.

Согласно другому аспекту изобретение относится к фармацевтическим композициям химерного полипептидного комплекса. В одном из воплощений изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие химерный полипептидный комплекс, выбранный из любого из химерных полипептидных комплексов, описанных в данном изобретении, и один или более чем один фармацевтически приемлемый эксципиент и возможно один или более чем один носитель или стабилизатор. В другом воплощении фармацевтическая композиция приготовлена для интрадермального, подкожного, внутривенного, интраартериального, интраабдоминального, внутрибрюшинного, интратекального или внутримышечного введения. В другом воплощении фармацевтическая композиция находится в жидкой форме. В схожем воплощении фармацевтическая композиция в жидкой форме поставляется в виде предварительно наполненного шприца для однократной инъекции. В других воплощениях фармацевтическая композиция приготовлена в виде лиофилизированного порошка, подлежащего разведению до введения.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способам и применениям химерного полипептидного комплекса или фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс. В одном из воплощений изобретения предложены химерный полипептидный комплекс или фармацевтическая композиция, содержащая химерный полипептидный комплекс, для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта. В схожем воплощении лекарственное средство применяют в случае заболевания, при этом заболевание выбрано из группы, состоящей из карциномы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, бластомы, рака молочной железы, рака молочной железы, положительного по рецептору эстрогенов/рецептору прогестерона (ER/PR+), Her2+ рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рака толстой кишки, рака толстой кишки со злокачественным асцитом, муцинозных опухолей, рака предстательной железы, рака головы и шеи, рака кожи, меланомы, рака мочеполовых путей, рака яичника, рака яичника со злокачественным асцитом, перитонеального карциноматоза, серозной карциномы матки, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, рака матки, мезотелиомы в брюшной полости, рака почки, опухоли Вильмса, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, желудочного рака, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака печени, гепатокарциномы, гепатобластомы, липосаркомы, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рака пищевода, рака слюнных желез, рака щитовидной железы, эпителиального рака, арренобластомы, аденокарциномы, саркомы и В-клеточного хронического лимфолейкоза.

Согласно другому аспекту изобретение относится к химерному полипептидному комплексу или фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, для применения в способе лечения заболевания у субъекта, при этом данный способ включает введение химерного полипептидного комплекса или фармацевтической композиции субъекту, имеющему заболевание, включая, но не ограничиваясь этим, рак. Там, где это желательно, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс и один или более эксципиентов. В одном из воплощений способа лечения заболевания выбрано из группы, состоящей из карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток ман-

тийной зоны, бластомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака предстательной железы, рака головы и шеи, любой формы рака кожи, меланомы, рака мочеполовых путей, рака яичника, рака яичника со злокачественным асцитом, перитонеального карциноматоза, серозной карциномы матки, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, эпителиального внутрибрюшинного новообразования со злокачественным асцитом, рака матки, мезотелиомы в брюшной полости, раковых заболеваний почки, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, желудочного рака, рака пищевода, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака печени, гепатокарциномы, гепатобластомы, липосаркомы, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рака слюнных желез, рака щитовидной железы, эпителиального рака, аденокарциномы, сарком любого происхождения, первичных гематологических злокачественных новообразований, включая острый или хронический лимфоцитарные лейкозы, острый или хронический миелогенные лейкозы, миелопролиферативного опухолевого заболевания или миелодиспластических расстройств, тяжелой миастении, Базедовой болезни, тиреоидита Хашимото или синдрома Гудпасчера. В другом воплощении способа лечения фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или более терапевтически эффективных доз, вводимых два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые три недели или один раз в месяц. В другом воплощении способа лечения фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или более доз в течение периода времени, составляющего по меньшей мере две недели, или по меньшей мере один месяц, или по меньшей мере два месяца, или по меньшей мере три месяца, или по меньшей мере четыре месяца, или по меньшей мере пять месяцев, или по меньшей мере шесть месяцев. В другом воплощении способа лечения дозу вводят интрадермально, подкожно, внутривенно, интраартериально, интраабдоминально, внутрибрюшинно, интратекально или внутримышечно. В другом воплощении способа лечения дозу вводят в виде болюс-дозы или посредством инфузии от 5 мин до 96 ч, как допускается в целях максимальной безопасности и эффективности. В другом воплощении способа лечения доза выбрана из группы, состоящей из по меньшей мере примерно 0,005 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,01 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,02 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,04 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,08 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,12 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,14 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,16 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,18 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,20 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,22 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,24 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,26 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,27 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,28 мг/кг, по меньшей мере 0,3 мг/кг, по меньшей мере 0,4 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,5 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,6 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,7 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,8 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,9 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,0 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,5 мг/кг или по меньшей мере примерно 2,0 мг/кг. В другом воплощении способа лечения начальная доза выбрана из группы, состоящей из по меньшей мере примерно 0,005 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,01 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,02 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,04 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,08 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг, а последующая доза выбрана из группы, состоящей из по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,12 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,14 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,16 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,18 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,20 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,22 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,24 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,26 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,27 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,28 мг/кг, по меньшей мере 0,3 мг/кг, по меньшей мере 0,4 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,5 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,6 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,7 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,8 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,9 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,0 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,5 мг/кг или по меньшей мере примерно 2,0 мг/кг. В другом воплощении способа лечения, в результате введения терапевтически эффективной дозы фармацевтической композиции субъекту концентрация химерного полипептидного комплекса в плазме крови данного субъекта составляет от по меньшей мере примерно 0,1 нг/мл до по меньшей мере примерно 2 нг/мл или больше в течение по меньшей мере примерно 3 суток, по меньшей мере примерно 7 суток, по меньшей мере примерно 10 суток, по меньшей мере примерно 14 суток или по меньшей мере примерно 21 суток.

В других воплощениях изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения в способе лечения заболевания, включающем введение фармацевтической композиции субъекту, имеющему данное заболевание, в соответствии со схемой лечения, включающей одно или более последовательных введений с использованием терапевтически эффективной дозы. В одном из воплощений фармацевтической композиции для применения в способе лечения заболевания данное заболевание выбрано из группы, состоящей из карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, бластомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака предстательной железы, рака головы и шеи, любой формы рака кожи, меланомы, рака мочеполовых путей, рака яичников, рака яичников со злокачественным асцитом, перитонеального карциноматоза, серозной карциномы матки, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, эпителиального внутрибрюшинного новообразования со злокачественным асцитом, рака матки, мезотелиомы в брюшной полости, раковых заболеваний почки, рака легкого, мел-

коклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, желудочного рака, рака пищевода, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака печени, гепатокарциномы, гепатобластомы, липосаркомы, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рака слюнных желез, рака щитовидной железы, эпителиального рака, аденокарцином, сарком любого происхождения, первичных гематологических злокачественных новообразований, включая острый или хронический лимфоцитарные лейкозы, острый или хронический миелогенные лейкозы, миелопролиферативного опухолевого заболевания или миелодиспластических расстройств, тяжелой миастении, Базедовой болезни, тиреоидита Хашимото или синдрома Гудпасчера. В другом воплощении фармацевтической композиции для применения в лечении заболевания данная схема лечения представляет собой часть предписанного цикла лечения, при этом предписанный цикл лечения включает введение фармацевтической композиции два раза в неделю, каждую неделю, каждые 10 суток, каждые две недели, каждые три недели или каждый месяц на каждый цикл лечения. В одном из воплощений применение такой схемы лечения приводит к улучшению клинического параметра или конечного показателя, ассоциированного с таким заболеванием у субъекта, при этом клинический параметр или конечный показатель выбраны из одной группы или любой комбинации из группы, состоящей из уменьшения размеров опухоли в виде полного, частичного или неполного ответа; времени до прогрессирования, времени до констатации отсутствия эффекта лечения, биомаркерной реакции; выживаемости без прогрессирования заболевания; выживаемости без признаков заболевания; времени до возникновения рецидива; времени до начала метастазирования; времени общей выживаемости; улучшения качества жизни и улучшения симптомов. В упомянутых выше воплощениях способа субъект выбран из группы, состоящей из мыши, крысы, обезьяны и человека.

Согласно другому аспекту изобретение относится к наборам, содержащим фармацевтическую композицию. В одном из воплощений изобретения предложен набор, содержащий фармацевтическую композицию по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, контейнер и этикетку или инструкцию по применению, размещенную на контейнере или прилагаемую к нему. В другом воплощении изобретения предложен набор, включающий в себя предварительно наполненный шприц, содержащий фармацевтическую композицию по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, и этикетку или инструкцию по применению, размещенную на шприце или прилагаемую к нему.

Согласно другому аспекту данное изобретение касается отличительных особенностей и эффектов интактных композиций химерного полипептидного комплекса по сравнению с расщепленными. В одном из воплощений изобретения предложен химерный полипептидный комплекс по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, при этом химерный полипептидный комплекс, который является интактным, имеет по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 1000 раз более низкую способность влиять на образование Th1-цитокинов (Т-клетки-хелперы 1 типа) эффекторной клеткой по сравнению с соответствующей первой частью комплекса, которая не находится в составе комплекса, в случае нахождения указанного комплекса в контакте с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью. В одном из воплощений образование Th1-цитокинов оценивали в анализе *in vitro*, в котором используются PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови) или CD3+ Т-клетки и клетки-мишени, имеющие опухолеспецифический маркерный антиген, выбранный из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцина), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального никотинового ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), сиализованного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухлеассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антиген Coraa, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антигена F19, альфафетопротеина (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. В упомянутом выше воплощении Th1-цитокин выбран из группы, состоящей из интерлейкина-2 (IL-2), TNF-альфа и IFN-гамма. В другом воплощении образование Th1-цитокина анализировали, используя образец крови или жидкости от субъекта, которому вводили химерный полипептидный комплекс, в сравнении с субъектом, которому вводили соответствующую первую часть, не находящуюся в составе химерного полипептидного комплекса, с получением того результата, что химерный полипептидный комплекс, который является интактным, обладает по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60

раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 1000 раз более низкой способностью влиять на образование Th1-цитокина. В упомянутом выше воплощении субъект выбран из группы, состоящей из мыши, крысы, обезьяны и человека.

В других случаях, химерный полипептидный комплекс по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, демонстрирует особенность, заключающуюся в том, что химерный полипептидный комплекс, который является интактным, обладает по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 раз, или по меньшей мере в 70 раз, или по меньшей мере в 80 раз, или по меньшей мере в 90 раз, или по меньшей мере в 100 раз более низкой способностью претерпевать экссудацию из кровотока при введении субъекту по сравнению с первой частью, не находящейся в составе химерного полипептидного комплекса, когда введен субъекту в сопоставимой дозе.

Согласно другому аспекту изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим заявленные композиции. В одном из воплощений изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, выбранную из (а) полинуклеотида, кодирующего химерный полипептидный комплекс по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, или (б) последовательности, комплементарной полинуклеотиду из (а). В другом воплощении изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью, приведенной в табл. 10 или 14. В другом воплощении изобретения предложен экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность из упомянутых выше воплощений и рекомбинантную регуляторную последовательность, функционально связанную с данной полинуклеотидной последовательностью. В другом воплощении изобретения предложена выделенная клетка-хозяин, содержащая упомянутый выше экспрессирующий вектор. В одном из воплощений клетка-хозяин представляет собой *E.coli*.

Согласно другому аспекту изобретение относится к связывающимся с Т-клетками композициям и нуклеиновым кислотам, которые их кодируют. В одном из воплощений изобретения предложен мономерный слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 7, при этом такой мономерный слитый белок демонстрирует аффинность связывания с антигеном CD3 Т-клетки. В другом воплощении изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, выбранную из (а) полинуклеотида, кодирующего слитый белок упомянутой выше связывающейся с Т-клеткой композиции, (б) полинуклеотидной последовательности, имеющей по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из полинуклеотидных последовательностей, приведенных в табл. 7; или (в) последовательности, комплементарной полинуклеотиду из пунктов (а) или (б).

В другом воплощении изобретения предложен способ применения нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок упомянутой выше связывающейся с Т-клеткой композиции, в способе получения полинуклеотидной последовательности, кодирующей химерный полипептидный комплекс по любому из воплощений химерного полипептидного комплекса, описанных в данном изобретении, в способе, включающем функциональное связывание полинуклеотидной последовательности, кодирующей scFv, обладающий аффинностью связывания с маркером клетки-мишени, описанным в данном изобретении или выбранным из группы мишеней, приведенных в табл. 2, в рамке считывания, с полинуклеотидом, кодирующим слитый белок на основе упомянутой выше описанной в данном изобретении связывающейся с Т-клеткой композиции. В другом воплощении изобретения предложен экспрессирующий вектор, содержащий упомянутую выше полинуклеотидную последовательность и рекомбинантную регуляторную последовательность, функционально связанную с данной полинуклеотидной последовательностью. Согласно изобретению также предложена выделенная клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор, при этом клетка-хозяин представляет собой *E.coli*.

Согласно еще одному аспекту изобретение относится к способам получения воплощений химерного полипептидного комплекса, описанных в данном изобретении. В одном из воплощений изобретения предложен способ получения химерного полипептидного комплекса, описанного в данном изобретении, включающий трансфекцию клетки-хозяина экспрессирующим вектором, кодирующим химерный полипептидный комплекс, культивирование клетки-хозяина в условиях, позволяющих экспрессировать химерный полипептидный комплекс в трансфицированной клетке-хозяине, и выделение химерного полипептидного комплекса в виде растворимого слитого белка. В некоторых воплощениях, по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% первого и второго связывающих доменов экспрессированного слитого белка являются правильно свернутыми.

В других случаях согласно изобретению предложены способы индуцирования гибели клетки-

мишени. Обычно способ включает приведение в контакт указанной клетки-мишени с химерным полипептидным комплексом по воплощению, описанному в данном изобретении, и эффекторной клеткой. В одном из воплощений результатом такого контакта является оказание воздействия на клетку-мишень, включая, но не ограничиваясь этим, утрату целостности мембраны, пикноз, кариорексис, стимулирование внутреннего пути апоптоза, стимулирование внешнего пути апоптоза, апоптоз, лизис клеток и гибель клеток.

Цитотоксичность, приводящую к гибели клеток (например, некрозу или апоптозу), можно оценить любым подходящим методом, включая, но не ограничиваясь этим, подсчет клеток до и после обработки или измерение уровня маркера, ассоциируемого с живыми или погибшими клетками. Показатель гибели клеток можно определить любым подходящим методом. В некоторых воплощениях показатель гибели клеток определяют относительно исходного состояния. Например, индивид может иметь известное исходное количество клеток-мишеней, например, исходную массу клеток или опухоль известного размера либо циркулирующие клетки-мишени в известной концентрации. В другом примере можно сравнивать показатель гибели клеток, вызванной воздействием одной композиции по сравнению с другой (например, химерный полипептидный комплекс с присоединенной объемной группировкой и химерный полипептидный комплекс без присоединенной объемной группировки). В таких случаях показатель гибели клеток можно выразить в виде отношения клеток, выживших после обработки, к исходной популяции клеток. В некоторых воплощениях показатель гибели клеток может быть определен с использованием подходящего анализа гибели клеток. В некотором воплощении показатель гибели клеток может быть определен путем измерения размера опухоли во времени. Существует ряд анализов гибели клеток, и для детекции можно использовать ряд методологий детекции. Примеры методологий детекции включают, без ограничения, применение методов окрашивания клеток, микроскопии, проточной цитометрии, клеточного сортирования и комбинаций этих методов. Другие неограничивающие примеры анализов гибели клеток описаны в заявках WO 2011131472A1 и US 20130052160, которые включены в данное описание посредством ссылки.

В одном из упомянутых выше воплощений данный способ используют в анализе *in vitro* с применением клеток, в котором используется смешанная популяция клеток-мишеней и эффекторных клеток и эффективное количество химерного полипептидного комплекса, обладающего аффинностью связывания с антигенами клетки-мишени и эффекторной клетки. В этом анализе клетка-мишень экспрессирует опухолеспецифический маркерный антиген, включая, но не ограничиваясь этим, альфа-4-интегрин, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антиген Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозид GD3, 9-О-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразу IX, CD44v6, продукт гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антиген I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликан меланомы (MCSP), CCR8, антиген эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелин, антиген A33, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмогелин 4, фетальный никотиновый ацетилхолиновый рецептор (fnAChR), CD25, раковый антиген 19-9 (CA19-9), раковый антиген 125 (CA-125), рецептор II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), стабилизированный антиген Tn (sTN), антиген активации фибробластов (FAP), эндосиалин (CD248), вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированный антиген L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антиген Томсена-Фриденрайха (антиген TF), рецептор инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антиген Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антиген F19, CA19-9, CA-125, альфафетопrotein (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2, и эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, при этом антиген эффекторной клетки представляет собой CD3. В других воплощениях способ индуцирования гибели клетки-мишени используют применительно к субъекту, имеющему рак, в который вовлечена популяция клетки-мишени, при этом данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества химерного полипептидного комплекса. В одном из упомянутых выше воплощений способ включает введение химерного полипептидного комплекса в виде одной или более последовательно вводимых терапевтически эффективных доз фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс и один или более эксципиентов. В еще одном из упомянутых выше воплощений способ включает схему определения количества фармацевтической композиции, необходимого для достижения терапевтического эффекта у субъекта, имеющего рак, и введения субъекту данного количества в виде одной или более последовательных доз. В способах индуцирования гибели клетки-мишени у субъекта, причем клеткой-мишенью является раковая клетка, указанный рак может представлять собой карциному, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, бластому, рак молочной железы, ER/PR+ рак молочной железы, Her2+ рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой кишки со злокачественным асцитом, муцинозные опухоли, рак предстательной железы, рак головы и шеи, рак кожи, меланому, рак мочеполовых путей, рак яичников, рак яичников со злокачественным асцитом, карциноматоз брюшины, серозную карциному матки, рак эндометрия, рак шейки матки, коло-

ректальный рак, рак матки, мезотелиому в брюшной полости, рак почки, опухоль Вильмса, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочный рак, рак желудка, рак тонкого кишечника, рак печени, гепатокарциному, гепатобластому, липосаркому, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, раковые заболевания желчного протока, рак пищевода, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, эпителиальный рак, арренобластому, аденокарциному, саркому и В-клеточный хронический лимфолейкоз. В результате применения способа по изобретению в отношении субъекта с диагнозом рак наблюдается улучшение клинического параметра или конечного показателя, при этом клинический параметр или конечный показатель может представлять собой общую выживаемость, конечные состояния симптомов, выживаемость без признаков заболевания, частоту объективных ответов, полный ответ, продолжительность ответа, выживаемость без прогрессирования заболевания, время до прогрессирования, время до констатации отсутствия эффекта лечения, показатель опухоли, размер опухоли, частоту ответа опухоли, время до начала метастазирования и концентрацию биомаркера. В других случаях, применение способа по изобретению в отношении субъекта с диагнозом рак приводит к уменьшению частоты возникновения, продолжительности или ослаблению тяжести выявленных при постановке диагноза побочных эффектов у такого субъекта по сравнению со случаем введения сопоставимому субъекту сопоставимой дозы, в ммоль/кг, заявленной композиции, содержащей первую часть при отсутствии второй части и третьей части химерного полипептидного комплекса, при этом побочные эффекты могут представлять собой одно или более чем одно из следующего: повышенные уровни IL-2 в плазме крови, повышенные уровни TNF-альфа в плазме крови, повышенные уровни IFN-гамма в плазме крови, сепсис, фебрильную нейтропению, нейротоксичность, судороги, энцефалопатию, синдром высвобождения цитокинов, расстройство речи, нарушение равновесия, лихорадку, головную боль, спутанность сознания, гипотензию, нейтропению, тошноту, нарушенное сознание, дезориентировка и повышенные уровни ферментов печени.

В других случаях согласно изобретению предложены способы доставки терапевтического агента к опухолевой клетке, содержащей опухолеспецифический маркер, причем данный способ включает введение в клетку-мишень химерного полипептидного комплекса по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, при этом терапевтический агент доставляют в клетку-мишень посредством первого связывающего домена первой части, специфично связывающегося с опухолеспецифическим маркером. В упомянутых выше воплощениях опухолеспецифический маркер выбран из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцина), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wnt-1, антигена I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), сиилированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антиген Coraа, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротеина (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. Там, где это желательно, опухолеспецифический маркер выбран из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, CEACAM5, CD19, CD20, CD33, CD38, cMET, CTLA4, EpCAM, EphA2, FOLR1, HER1(EGFR), HER2, HER3, HER1(EGFR)/HER3, HER2/3, мезотелина, MUC1, PD-L1, PSMA, TAG-72, VEGFR1, VEGFR2. В одном из воплощений способа химерный полипептидный комплекс содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей табл. 12. В другом воплощении способа химерный полипептидный комплекс содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных на фиг. 36 или 37. В одном из воплощений вышеупомянутых способов опухолевая клетка находится в опухоли субъекта, при этом таким субъектом могут быть мышь, крыса, обезьяна, собака и человек.

Согласно другому аспекту данное изобретение относится к физическим характеристикам композиции химерного полипептидного комплекса и полученным свойствам при введении субъекту. Примени-

тельно к воплощениям химерного полипептидного комплекса, описанным в данном изобретении, ни вторая часть, ни третья часть химерного полипептидного комплекса не обладает аффинностью специфического связывания с первой частью. Что касается каждого из воплощений химерного полипептидного комплекса, описанных в данном изобретении, то первая часть на первую часть приходится менее 50% молекулярной массы интактного химерного полипептидного комплекса. В другом случае, на первую часть воплощений химерного полипептидного комплекса, описанных в данном изобретении, приходится менее 30%, или менее 40%, или менее 50% от фактора кажущейся молекулярной массы химерного полипептидного комплекса, при определении фактора кажущейся молекулярной массы посредством гель-проникающей хроматографии. Кроме того, в результате расщепления второй части и высвобождения указанной первой части и указанной третьей части из любого из воплощений химерного полипептидного комплекса, описанных в данном изобретении, гидродинамический радиус высвободившейся первой части составляет менее чем примерно 30%, или менее чем примерно 40%, или менее чем примерно 50% от гидродинамического радиуса интактного химерного полипептидного комплекса, в случае оценки гидродинамического радиуса посредством гель-проникающей хроматографии. В одном из воплощений изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом в результате расщепления второй части и высвобождения указанной первой части и указанной третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса, гидродинамический радиус высвободившейся первой части составляет менее чем примерно 5 нм, или менее чем примерно 4 нм, или менее чем примерно 3 нм в случае определения гидродинамического радиуса посредством гель-проникающей хроматографии. Соответственно, высвободившаяся первая часть обладает более значительной способностью проникать в опухолевую ткань по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом. В другом воплощении гидродинамический радиус интактного химерного полипептидного комплекса, описанного в данном изобретении, составляет более чем примерно 8 нм, или более чем примерно 9 нм, или более чем примерно 10 нм в случае определения гидродинамического радиуса посредством гель-проникающей хроматографии. Соответственно, интактный химерный полипептидный комплекс, введенный субъекту с опухолью, обладает меньшей способностью претерпевать экссудацию из сосудистой системы нормальной ткани субъекта по сравнению со способностью претерпевать экссудацию из сосудистой системы опухоли.

В частности, предполагается, что воплощения композиций химерного полипептидного комплекса могут проявлять одно свойство или несколько свойств или любую комбинацию свойств, изложенных в данном описании. В частности, также предполагается, что способы лечения могут демонстрировать одно свойство или несколько свойств или любую комбинацию свойств, изложенных в данном описании.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, каждый отдельный патент или каждая отдельная патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

Краткое описание графических материалов

Признаки и преимущества изобретения могут быть далее разъяснены посредством ссылки на следующее далее подробное описание и прилагаемые графические материалы, где описываются иллюстративные воплощения.

На фиг. 1 изображены различные схематичные фигуры, использованные в различных графических материалах, вместе с описаниями того, что они представляют.

На фиг. 2 изображена композиция ProTIA (протеаза-запускаемый иммунный активатор) (также описанного в данном изобретении как химерный полипептидный комплекс), которая находится в нерасщепленной, "про"-форме, и в расщепленном состоянии после воздействия на нее ассоциированной с опухолью протеазы. На данной фигуре также описаны некоторые из неограничивающих свойств обеих форм композиций.

На фиг. 3 показана нерасщепленная "про"-форма, изображенная на фиг. 3А, и расщепленная форма, изображенная на фиг. 3В, при этом нерасщепленная форма изображена вблизи эффекторной клетки и ассоциированной с опухолью клетки, каждая из которых содержит антигены на клеточной поверхности; однако, нерасщепленная форма, изображенная на фиг. 3А, не способна одновременно связываться с этими двумя клетками вследствие стерических затруднений и экранирующих эффектов, обуславливаемых объемной группировкой в отношении направляющих (или связывающих) доменов, тогда как расщепленная форма, изображенная на фиг. 3В, с высвободившимися направляющими доменами допускает одновременное связывание этих двух клеток и позволяет осуществлять иммунную активацию посредством эффекторной клетки в отношении целевой ассоциированной с опухолью клетки.

На фиг. 4 показаны схематичные представления двух конфигураций композиций ProTIA, иллюстрирующие, что отделяемый сегмент и объемная группировка могут быть присоединены либо к группировке, связывающейся с эффекторной клеткой, либо к группировке, связывающейся с опухолевым антигеном.

На фиг. 5 показаны схематичные представления двух конфигураций композиций ProTIA, в которых к связывающим группировкам присоединены два отделяемых сегмента и две объемные группировки. В

случае фиг. 5А, один RS и одна объемная группировка присоединены к группировке, связывающейся с эффекторной клеткой, а другой RS и другая объемная группировка присоединены к группировке, связывающейся с опухолевым антигеном, и композиция будет в конфигурации scFv. В случае фиг. 5В, RS, и объемные группировки присоединены либо к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (слева), либо к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (справа), и связывающие группировки будут в конфигурации диатела (что позволяет вследствие этого получать композицию в рекомбинантной форме).

На фиг. 6А-6D показаны схематичные представления двух конфигураций композиций ProTIA, в которых объемная группировка представляет собой полипептид XTEN, и RS и объемная группировка присоединены или к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (слева), или RS и объемная группировка присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (справа).

На фиг. 7 показаны схематичные представления двух конфигураций композиций ProTIA, в которых два отделяемых сегмента и два XTEN присоединены к связывающим группировкам. В случае фиг. 7А, один RS и один XTEN присоединены к группировке, связывающейся с эффекторной клеткой, а другие RS и объемная группировка присоединены к группировке, связывающейся с опухолевым антигеном, и такая композиция будет находиться в конфигурации scFv. В случае фиг. 7В, RS, и XTEN присоединены либо к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (справа), либо к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (слева), и такие связывающие группировки будут находиться в конфигурации диатела (что позволяет вследствие этого получать композицию в рекомбинантной форме).

На фиг. 8 показаны схематичные представления двух конфигураций композиций ProTIA, в которых RS и объемная группировка присоединены или к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (слева), или к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (справа). На фиг. 8А в виде XTEN изображены связывающие группировки. На фиг. 8В в виде альбумина изображены связывающие группировки. На фиг. 8С в виде Fc фрагмента изображены связывающие группировки.

На фиг. 9 показаны схематичные представления конфигураций композиций ProTIA, в которых два отделяемых сегмента и две объемные группировки присоединены к связывающим группировкам. На фиг. 9А изображены три конфигурации, в которых два RS и XTEN присоединены как к связывающейся с эффекторной клеткой группировке, так и к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (слева), к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (в центре) или к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (справа). На фиг. 9В изображены четыре конфигурации, в которых один RS и XTEN присоединены к связывающейся с эффекторной клеткой группировке, и один RS и альбумин присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (слева сверху); один RS и XTEN присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке, и один RS и альбумин присоединены к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (справа сверху); как RS и XTEN, так и RS и альбумин присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (слева снизу), и как RS и XTEN, так и RS и альбумин присоединены к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (справа снизу). На фиг. 9С изображены четыре конфигурации, в которых один RS и XTEN присоединены к связывающейся с эффекторной клеткой группировке, и один RS и Fc присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (слева сверху); один RS и XTEN присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке, и один RS и Fc присоединены к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (справа сверху); как RS и XTEN, так и RS и Fc присоединены к связывающейся с опухолевым антигеном группировке (слева снизу), и как RS и XTEN, так и RS и Fc присоединены к связывающейся с эффекторной клеткой группировке (справа снизу).

На фиг. 10 показаны схематичные представления ProTIA вблизи опухолевой ткани (слева) и нормальной ткани (справа), при этом более проникаемая сосудистая система в опухолевой ткани позволяет ProTIA претерпевать экссудацию в ткань, где опухолеассоциированные протеазы могут действовать на RS, расщепляя его и высвобождая связывающие группировки, которые в свою очередь могут одновременно связываться с эффекторной клеткой и опухолеассоциированной клеткой. В случае нормальной ткани экстравазация либо блокируется более непроницаемыми барьерами сосудистой системы, либо, в случае, когда ProTIA претерпевает экссудацию, ProTIA остается в "про"-форме и при этом, несмотря на способность связываться с эффекторной клеткой, какие-либо опухолевые клетки отсутствуют, или, если присутствуют, для высвобождения связывающих группировок недостаточно присутствующих протеаз, с тем конечным результатом, что иммунологический синапс не образуется.

На фиг. 11 показано схематичное представление, в конфигурации scFv, группировки, связывающейся с эффекторной клеткой, и группировки, связывающейся с опухолевым антигеном, при этом каждая из них имеет пары VH/VL, соединенные посредством линкеров, и находится в tandemном формате.

На фиг. 12 показано схематичное представление группировки, связывающейся с эффекторной клеткой, и группировки, связывающейся с опухолевым антигеном, в конфигурации диатела, каждая из которых имеет пары VH/VL, соединенные линкерами.

На фиг. 13А показано схематичное представление общего строения конструкции. На фиг. 13В и 13С показаны схематичные представления композиций ProTIA, в которых группировка, связывающаяся с эффекторной клеткой, и группировка, связывающаяся с опухолевым антигеном, находятся в различных

сочетаниях в конфигурации scFv (фиг. 13B) (с переменными доменами тяжелой цепи (VH) и переменными доменами легкой цепи (VL), соединенными либо внутримолекулярным длинным линкером (L), либо межмолекулярным более коротким линкером (1)) и в конфигурации диатела (фиг. 13C) (с VH- и VL-доменами, соединенными либо длинным линкером (L), либо межмолекулярным более коротким линкером (1)).

На фиг. 14 показаны результаты очистки нерасщепленной конструкции AC1278 из среды ферментации, описанной в примере 2. На фиг. 14A показаны результаты типичного SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) для захваченной с использованием IMAC (аффинная хроматография с иммобилизованным металлом) конструкции AC1278 из среды ферментации; на фиг. 14B показаны результаты SDS-PAGE анализа фракций со стадии тонкой очистки с использованием HIC (гидрофобная хроматография); на фиг. 14C показаны результаты SDS-PAGE анализа фракций со стадии тонкой очистки с использованием ImpRes-Q.

На фиг. 15 показана аналитическая информация о выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1278, описанной в примере 2. На фиг. 15A показаны результаты аналитической SEC хроматографии для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1278 (в виде сплошной линии) в сравнении со стандартами XTEN разной длины (в виде пунктирной линии); на фиг. 15B показаны результаты SDS-PAGE для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1278.

На фиг. 16 показано получение отщепленного ProTIA-A из нерасщепленной конструкции AC1278, описанное в примере 2. На фиг. 16A показаны результаты SDS-PAGE анализа реакционной смеси после расщепления под действием MMP-9; на фиг. 16B показаны результаты SDS-PAGE анализа реакционной смеси после расщепления под действием MMP-9 и после очистки посредством IMAC с целью удаления отщепленного сегмента XTEN.

На фиг. 17 показана аналитическая информация о выпущенной партии расщепленной конструкции AC1278, описанной в примере 2. На фиг. 17A показаны результаты аналитической SEC хроматографии для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1278 (в виде сплошной линии) в сравнении со стандартами глобулярных белков (в виде пунктирной линии); на фиг. 17B показаны результаты SDS-PAGE для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1278.

На фиг. 18 показаны результаты очистки нерасщепленной конструкции AC1476 из среды ферментации, описанной в примере 3. На фиг. 18A показаны результаты типичного SDS-PAGE для захваченной с использованием IMAC конструкции AC1476 из среды ферментации; на фиг. 18B показаны результаты SDS-PAGE анализа фракций со стадии тонкой очистки с использованием HIC; на фиг. 18C показаны результаты SDS-PAGE анализа фракций со стадии тонкой очистки с использованием ImpRes-Q.

На фиг. 19 показана аналитическая информация о выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476, описанной в примере 3. На фиг. 19A показаны результаты аналитической SEC хроматографии для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476 (в виде сплошной линии) в сравнении со стандартами XTEN разной длины (в виде пунктирной линии); на фиг. 19B показаны результаты SDS-PAGE для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476 с окрашиванием кумасси; на фиг. 19C показаны результаты SDS-PAGE для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476 с окрашиванием серебром.

На фиг. 20 показана дополнительная аналитическая информация о выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476, описанной в примере 3. На фиг. 20A показаны результаты ESI-MS (масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией) для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476; на фиг. 20B показаны результаты катионообменной хроматографии для выпущенной партии нерасщепленной конструкции AC1476.

На фиг. 21 показано получение отщепленного ProTIA-A из нерасщепленной конструкции AC1476, описанное в примере 3. На фиг. 21A показаны результаты SDS-PAGE анализа реакционной смеси после расщепления под действием MMP-9; на фиг. 21B показаны результаты SDS-PAGE анализа фракций, полученных посредством анионообменной хроматографии смеси после расщепления под действием MMP-9 с целью удаления нерасщепленного субстрата, а также отщепленного сегмента XTEN.

На фиг. 22 показана аналитическая информация о выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476, описанной в примере 3. На фиг. 22A показаны результаты аналитической SEC хроматографии для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476 (в виде сплошной линии) в сравнении со стандартами глобулярных белков (в виде пунктирной линии); на фиг. 22B показаны результаты SDS-PAGE для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476 с окрашиванием кумасси; на фиг. 22C показаны результаты SDS-PAGE для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476 с окрашиванием серебром.

На фиг. 23 показана дополнительная аналитическая информация о выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476, описанной в примере 3. На фиг. 23A показаны результаты ESI-MS для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476; на фиг. 23B показаны результаты катионообменной хроматографии для выпущенной партии расщепленной конструкции AC1476.

На фиг. 24 показано связывание обработанного и не обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA со своим лигандом, которое описано в примере 4.

На фиг. 25 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного и не обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 6.

На фиг. 26 изображены результаты эксперимента по определению специфичности *in vitro* анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 6.

На фиг. 27 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного протеазой и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 6.

На фиг. 28 изображены результаты эксперимента по определению ФК (фармакокинетических параметров) обработанного и не обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 9.

На фиг. 29 показаны схематичные представления альтернативных конфигураций (от N- к С-концу) связывающейся с Т-клеткой композиции. На фиг. 29А показана конфигурация группировки, связывающейся с эффекторной клеткой (ЕСВМ), со следующими за ней отделяемым сегментом (RS) и XTEN, в то время как на фиг. 29В показана конфигурация с XTEN со следующими за ним сегментом RS и затем ЕСВМ.

На фиг. 30 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного протеазой и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в SK-OV-3, описанного в примере 6.

На фиг. 31 изображены результаты измерений объема опухоли из эксперимента по определению противоопухолевого эффекта, оказываемого обработанным и не обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 10.

На фиг. 32 изображены результаты измерений массы тела (BW) из эксперимента по определению противоопухолевого эффекта, оказываемого обработанным и не обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 10.

На фиг. 33 изображены результаты эксперимента по определению цитокинового профиля для обработанного протеазой и не обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 12. На фиг. 33А показаны результаты анализа по определению IL-2, а на фиг. 33В показаны результаты по определению IL-4.

На фиг. 34 изображены результаты эксперимента по определению цитокинового профиля для обработанного протеазой и не обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 12. На фиг. 34А показаны результаты анализа по определению IL-6, а на фиг. 34В показаны результаты по определению IL-10.

На фиг. 35 изображены результаты эксперимента по определению цитокинового профиля для обработанного протеазой и не обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (aEpCAM-aCD3), описанного в примере 12. На фиг. 35А показаны результаты анализа по определению IFN-гамма, а на фиг. 35В показаны результаты по определению TNF-альфа.

Фиг. 36. Аминокислотная последовательность aEpCAM-aCD3 ProTIA, конструкции AC1476.

Фиг. 37. Аминокислотная последовательность AEpCAM-aCD3 ProTIA, конструкции AC1489.

На фиг. 38 изображены результаты измерений объема опухоли НСТ-116 из эксперимента по определению противоопухолевого эффекта, оказываемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и нерасщепляемым анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 13.

На фиг. 39 изображены результаты измерений массы тела из эксперимента по определению противоопухолевого эффекта в отношении НСТ-116, оказываемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и нерасщепляемым анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 13.

На фиг. 40 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в SK-OV-3 с очищенными CD3-положительными Т-клетками человека, описанного в примере 14.

На фиг. 41 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в OVCAR-3 (линия клеток рака яичников) с очищенными CD3-положительными Т-клетками человека, описанного в примере 14.

На фиг. 42 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации CD69 в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании PBMC и SK-OV-3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 42А изображена активация CD69 на CD8 клетках, в то время как на фиг. 42В изображена активация CD69 на CD4 клетках.

На фиг. 43 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации как CD69, так и CD25 в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании PBMC и SK-OV-3 клеток вместе с обрабо-

танным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 43А изображена активация как CD69, так и CD25 в CD8 клетках, в то время как на фиг. 43В изображена активация как CD69, так и CD25 в CD4 клетках.

На фиг. 44 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации CD69 в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании очищенных CD3+ клеток и SK-OV-3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 44А изображена активация CD69 в CD8 клетках, в то время как на фиг. 44В изображена активация CD69 в CD4 клетках.

На фиг. 45 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации как CD69, так и CD25 на CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании CD3+ клеток и SK-OV-3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 45А изображена активация как CD69, так и CD25 в CD8 клетках, в то время как на фиг. 45В изображена активация как CD69, так и CD25 в CD4 клетках.

На фиг. 46 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации CD69 в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании очищенных CD3+ клеток и OVCAR3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 46А изображена активация CD69 в CD8 клетках, в то время как на фиг. 46В изображена активация CD69 в CD4 клетках.

На фиг. 47 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации как CD69, так и CD25 в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании CD3+ клеток и OVCAR3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 47А изображена активация как CD69, так и CD25 в CD8 клетках, в то время как на фиг. 47В изображена активация как CD69, так и CD25 в CD4 клетках.

На фиг. 48 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации CD69 в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании PBMC и OVCAR3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 48А изображена активация CD69 в CD8 клетках, в то время как на фиг. 48В изображена активация CD69 в CD4 клетках.

На фиг. 49 изображены результаты эксперимента по измерению уровня активации как CD69, так и гранзима В в CD8 и CD4 клетках при совместном культивировании PBMC и OVCAR3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 8. На фиг. 49А изображена активация как CD69, так и гранзима В в CD8 клетках, в то время как на фиг. 49В изображена активация как CD69, так и гранзима В в CD4 клетках.

На фиг. 50 изображены результаты эксперимента по измерению высвобождения цитокинов IL-2 и IL-4 при совместном культивировании очищенных CD3+ клеток и SK-OV-3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 15. На фиг. 50А изображена концентрация высвободившегося IL-2, в то время как на фиг. 50В изображена концентрация высвободившегося IL-4.

На фиг. 51 изображены результаты эксперимента по измерению высвобождения цитокинов IL-6 и IL-10 при совместном культивировании очищенных CD3+ клеток и SK-OV-3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 15. На фиг. 51А изображена концентрация высвободившегося IL-6, в то время как на фиг. 51В изображена концентрация высвободившегося IL-10.

На фиг. 52 изображены результаты эксперимента по измерению высвобождения цитокинов TNF-альфа и IFN-гамма при совместном культивировании очищенных CD3+ клеток и SK-OV-3 клеток вместе с обработанным протеазой, не обработанным и не расщепляемым протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 15. На фиг. 52А изображена концентрация высвободившегося TNF-альфа, в то время как на фиг. 52В изображена концентрация высвободившегося IFN-гамма.

На фиг. 53 показаны кривые связывания с лигандами CD3εδ для обработанного протеазой, необработанного протеазой и нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 16.

На фиг. 54 показана специфичность связывания обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA с лигандом rhEpCAM (рекомбинантная EpCAM человека), описанного в примере 17.

На фиг. 55 изображены результаты измерения объема опухоли SW480 из эксперимента по определению противоопухолевого эффекта, оказываемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и нерасщепляемым анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 18.

На фиг. 56 изображены результаты измерения массы тела из эксперимента по определению противоопухолевого эффекта в отношении SW480, оказываемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и нерасщепляемым анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, описанного в примере 18.

На фиг. 57 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанно-

го протеазой, не обработанного протеазой и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 Pro-TIA в SK-OV-3 вместе с PBMC человека, описанного в примере 23.

На фиг. 58 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного протеазой и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 Pro-TIA в OVCAR3 вместе с PBMC человека, описанного в примере 23.

На фиг. 59 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного протеазой и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 Pro-TIA в HCT116 вместе с PBMC человека, описанного в примере 23.

На фиг. 60 изображены результаты эксперимента по определению активности *in vitro* обработанного протеазой, не обработанного протеазой и не расщепляемого протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 Pro-TIA в SW480 вместе с PBMC человека, описанного в примере 23.

Подробное описание изобретения

До ознакомления с описанием воплощений по изобретению следует понимать, что такие воплощения приведены только в качестве примера и что при практическом осуществлении данного изобретения могут быть использованы различные альтернативные варианты воплощений изобретения, описанных в данном изобретении. Специалистами в данной области техники могут быть сделаны многочисленные вариации, изменения и замены без отклонения от сущности изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в данном описании, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой данное изобретение относится. Хотя при практическом применении или тестировании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные изложенным в данном описании, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае возникновения конфликта контролю будет подлежать описание патента, включая определения. В дополнение к этому, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. И теперь специалистами в данной области техники будут сделаны многочисленные вариации, изменения и замены без отклонения от сущности изобретения.

Определения

В контексте настоящего изобретения приведенные ниже термины имеют приписываемые им значения, если не указано иное.

Как использовано по всему тексту описания и формулы изобретения, термины единственного числа используются в том смысле, что они означают "по меньшей мере один/одна/одно", "по меньшей мере первый/первая/первое", "один/одна/одно или более" или "множество" из упоминаемых компонентов или стадий, за исключением случаев, где далее специально указан верхний предел. Так, термин "расщепляемая последовательность", использованный в данном описании, означает "по меньшей мере первую расщепляемую последовательность", но включает в себя множество расщепляемых последовательностей. Пригодные пределы и параметры комбинаций, как и количества любого отдельного агента, будут известны специалистам средней квалификации в данной области техники с учетом описания настоящего изобретения.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном описании взаимозаменяемо в отношении состоящих из аминокислот полимеров любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и он может быть "прерван" не являющимися аминокислотами соединениями. Данные термины также охватывают состоящий из аминокислот полимер, который модифицирован, например, в результате образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любого другого действия, например, конъюгирования с применяемым для мечения компонентом.

Термин "мономерный" в применении к полипептиду относится к состоянию полипептида в виде одной непрерывной аминокислотной последовательности, по существу не связанной с одним или более чем одним дополнительным полипептидом такой же или другой последовательности. Мономерное состояние полипептида можно оценить как единичную белковую структуру такой же молекулярной массы посредством гель-проникающей хроматографии.

Использованный в данном описании термин "аминокислота" относится либо к природным и/или неприродным, либо синтетическим аминокислотам, включая, но не ограничиваясь этим, как оптические D- или L-изомеры, так и аминокислотные аналоги и пептидомиметики. Для обозначения аминокислот можно использовать стандартные одно-или трехбуквенные коды.

Термин "природная L-аминокислота" или "L-аминокислота" означает оптические L-изомерные формы глицина (G), пролина (P), аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), метионина (M), цистеина (C), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), лизина (K), аргинина (R), глутамина (Q), аспарагина (N), глутаминовой кислоты (E), аспарагиновой кислоты (D), серина (S) и треонина (T).

Термин "неприродный" в применении к последовательностям и как использовано в данном описании, означает полипептидные или полинуклеотидные последовательности, которые не имеют аналога, не

являются комплементарными или не имеют высокой степени гомологии с последовательностью дикого типа или природной последовательностью, обнаруживаемой у млекопитающего. Например, неприродный полипептид или фрагмент может иметь не более 99, 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50% или даже меньше идентичности аминокислотной последовательности по сравнению с природной последовательностью при надлежащем выравнивании.

Термины "гидрофильный" и "гидрофобный" относятся к степени сродства, которое вещество имеет с водой. Гидрофильное вещество имеет высокое сродство к воде, проявляя тенденцию растворяться в воде, смешиваться с водой или смачиваться водой, тогда как у гидрофобного вещества по существу отсутствует сродство к воде, что выражается в тенденции отталкивать и не абсорбировать воду и в тенденции не растворяться в воде, или не смешиваться с водой, или не смачиваться водой.

Аминокислоты могут быть охарактеризованы с учетом их гидрофобности. Разработан ряд шкал. Примером является шкала, разработанная Levitt M. и др. (*J. Mol. Biol.* (1976), 104: 59), которая изложена в Норр Т.Р. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981), 78: 3824. Примерами "гидрофильных аминокислот" являются аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин и глутамин. Особый интерес представляют гидрофильные аминокислоты аспартат, глутамат и серин и глицин. Примерами "гидрофобных аминокислот" являются триптофан, тирозин, фенилаланин, метионин, лейцин, изолейцин и валин.

"Фрагмент", применительно к биологически активному белку (а не к антителу), относится к укороченной форме биологически активного белка, которая сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. "Вариант", в применении к биологически активному белку, относится к белку, имеющему гомологию последовательности нативного биологически активного белка, который сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности биологически активного белка. Например, вариант белка может иметь по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность аминокислотной последовательности по сравнению с референсным биологически активным белком. Используемый в данном описании термин "биологически активный вариант белка" включает белки, модифицированные специально, например, посредством сайт-специфического мутагенеза, синтеза кодирующего гена, вставок, или случайным образом посредством мутаций, и которые сохраняют активность.

Термин "вариант последовательности" относится к полипептидам, которые модифицированы по сравнению с их нативной или исходной последовательностью посредством одной или нескольких аминокислотных вставок, делеций или замен. Вставки могут быть локализованы на любом конце или обоих концах белка и/или могут быть расположены во внутренних участках аминокислотной последовательности. Неограничивающим примером является замена аминокислоты в XTEN на другую аминокислоту. В вариантах с делециями удалены один или более аминокислотных остатков в полипептиде, который описан в данном изобретении. Таким образом, варианты с делециями включают все фрагменты описанной полипептидной последовательности. В вариантах с заменами один или более аминокислотных остатков полипептида удалены и заменены на альтернативные остатки. Согласно одному из аспектов, такие замены консервативны по своей природе, и консервативные замены этого типа хорошо известны в данной области техники.

Термин "группировка" означает компонент более крупной композиции или компонент, который предназначен для встраивания в более крупную композицию, как например, белковая часть, присоединенная к более крупному полипептиду в виде смежной или несмежной последовательности. Группировка более крупной композиции может придавать желаемую функциональность. Например, объемная группировка может придавать функциональность, заключающуюся в увеличении молекулярной массы и/или периода полувыведения получающейся в результате более крупной композиции, с которой данная объемная группировка связана.

Термин "отделяемый сегмент" или "RS" относится к расщепляемой последовательности в композициях, которая может распознаваться и расщепляться одной или несколькими протеазами, что приводит к высвобождению одной или нескольких частей или группировок из такой композиции. Как использовано в данном описании, "протеаза млекопитающих" означает протеазу, которая обычно присутствует в жидкостях, клетках, тканях организма и может быть обнаружена в более высоких концентрациях в некоторых тканях-мишенях или клетках-мишенях, например, в пораженных заболеванием тканях (например, в опухоли) млекопитающего. Последовательности RS могут быть сконструированы с возможностью расщепления под действием различных протеаз млекопитающих или комплексных протеаз млекопитающих, которые присутствуют в тканях-мишенях субъекта или вблизи них или которые вводят в анализе *in vitro*. Могут быть использованы другие эквивалентные протеазы (эндогенные или экзогенные), которые способны распознавать определенный сайт расщепления. В частности, предполагается, что последовательность RS может быть откорректирована и адаптирована к используемой протеазе и может включать линейные аминокислоты для присоединения к соседним полипептидам.

Термин "в пределах", при ссылке на первый полипептид, находящийся в связанном состоянии со вторым полипептидом, охватывает присоединение дополнительного компонента или слияние с дополнительным компонентом, который соединяет N-конец первого или второго полипептида с C-концом второго или первого полипептида, соответственно, а также вставку первого полипептида в последовательность

второго полипептида. Например, в случае присоединения компонента RS "в пределах" химерного полипептидного комплекса RS может быть присоединен к N-концу, C-концу или может быть встроен между любыми двумя аминокислотами полипептида XTEN.

"Активность" применительно к форме(ам) композиции, предложенной в данном изобретении, относится к действию или эффекту, включая, но не ограничиваясь этим, связывание с рецептором, антагонистическую активность, агонистическую активность, клеточный или физиологический ответ, лизис клеток, гибель клеток или эффект, обычно известный в данной области техники применительно к осуществляемому этот эффект компоненту композиции, независимо от того, измерен ли он в анализе *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* либо представляет собой клинический эффект.

Термин "эффекторная клетка", использованный в данном описании, включает в себя любые эукариотические клетки, способные оказывать влияние на клетку-мишень. Например, эффекторная клетка может индуцировать утрату целостности мембраны, пикноз, кариорексис, апоптоз, лизис и/или гибель клетки-мишени. В другом примере эффекторная клетка может индуцировать деление, рост, дифференцировку клетки-мишени или иным образом изменять передачу сигнала в клетке-мишени. Неограничивающие примеры эффекторной клетки включают плазматическую клетку, Т-клетку, CD4 клетку, CD8 клетку, В-клетку, цитокин-индуцируемую киллерную клетку (CIK клетку), тучную клетку, дендритную клетку, регуляторную Т-клетку (T_{reg}-клетку), хелперную Т-клетку, миелоидную клетку, макрофаг и NK клетку.

"Антиген эффекторной клетки" относится к молекулам, экспрессируемым эффекторной клеткой, включая, без ограничения, молекулы клеточной поверхности, такие как белки, гликопротеины или липопротеины. Типичные антигены эффекторных клеток включают белки CD3 комплекса или Т-клеточный рецептор (TCR), CD4, CD8, CD25, CD38, CD69, CD45RO, CD57, CD95, CD107 и CD154, а также такие эффекторные молекулы, как цитокины, в ассоциации с эффекторной клеткой, в связанном состоянии с эффекторной клеткой, экспрессируемые внутри эффекторной клетки или экспрессируемые и секретирываемые эффекторной клеткой. Антиген эффекторной клетки может служить в качестве связывающего аналога связывающего домена заявленного химерного полипептидного комплекса. Неограничивающие примеры антигенов эффекторных клеток, с которыми может связываться заявленная композиция, включают антигены клеточной поверхности, такие как CD3, CD4, CD8, CD25, CD38, CD69, CD45RO, CD57, CD95, CD107 и CD154, а также Th1 цитокины, выбранные из IL2, IL10, IL12, IFN γ и TNF α .

Использованный в данном описании термин "ELISA" относится к иммуноферментному твердофазному анализу, изложенному в данном описании, или иным образом известному в данной области техники.

"Клетка-хозяин" включает отдельную клетку или клеточную культуру, которая может быть реципиентом или представляла собой реципиент для заявленных векторов, в которые введена экзогенная нуклеиновая кислота, например, описанных в данном изобретении. Клетки-хозяева включают потомство единственной клетки-хозяина. Потомство может необязательно быть полностью идентичным (по морфологическим признакам или полному геномному составу ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* вектором по данному изобретению.

Термин "выделенный", в случае использования для описания различных полипептидов, раскрытых в данном изобретении, означает полипептид, который идентифицирован и отделен от компонента и/или извлечен из компонента своего природного окружения или из более сложной смеси (например, при очистке белков). Примесными компонентами его природного окружения являются вещества, которые обычно могут препятствовать диагностическому или терапевтическому применениям полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Как очевидно специалистам в данной области техники, неприродный полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или его фрагменты не требуют "выделения", в отличие от их природных аналогов. В дополнение к этому, "концентрированные", "отделенные" или "разбавленные" полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или его фрагменты могут отличаться от своих природных аналогов тем, что их концентрация или число молекул на единицу объема как правило больше, чем у их природных аналогов. В общем случае, полипептид, полученный рекомбинантными способами и экспрессированный в клетке-хозяине, считается "выделенным".

"Выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от молекулы по меньшей мере одной примесной нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в природном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Например, выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, отличается по форме или окружению, в которых она обнаруживается в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, отличаются от определенной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, которая существует в природных клетках. Тем не менее, выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, включает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, содержащиеся в клетках, которые обычно экспрессируют данный полипептид, при этом, например, молекула нуклеиновой кислоты находится в хромосоме или вне хромосомы, и расположение ее отличается от расположения в природных клетках.

"Химерный" белок или полипептид содержит по меньшей мере один слитый полипептид, содержа-

щий в последовательности по меньшей мере один участок в другом положении, чем то, в котором он находится в природе. Такие участки обычно могут присутствовать в разных белках, а в слитом полипептиде объединены вместе; или они могут обычно присутствовать в одном и том же белке, но в слитом полипептиде помещены в новом расположении. Химерный белок может быть создан, например, путем химического синтеза или путем создания и транслирования полинуклеотида, в котором пептидные участки кодируются в желаемом взаимном расположении.

Термины "слитый" и "слияние" используются в данном описании взаимозаменяемо и относятся к объединению воедино двух или более пептидных или полипептидных последовательностей рекомбинантным методом. "Слитый белок" или "химерный белок" содержит первую аминокислотную последовательность, присоединенную ко второй аминокислотной последовательности, с которой она не соединена в естественных условиях в природе.

"XTEN-илированный" используется для обозначения пептида или полипептида, который модифицирован посредством объединения воедино или слияния одного или более полипептидов XTEN (описанных ниже) с пептидом или полипептидом независимо от того, используется ли для этого методика рекомбинантного или химического перекрестного сшивания.

Термин "функционально связанный" означает, что соединенные друг с другом последовательности ДНК являются смежными и находятся в фазе или в рамке считывания. Термин "слияние в рамке" относится к присоединению друг к другу двух или более открытых рамок считывания (ORF) с образованием непрерывной ORF большей длины способом, при котором поддерживается правильная рамка считывания исходных ORF. Например, промотор или энхансер считается функционально связанным с кодирующей полипептид последовательностью, если он участвует в транскрипции полипептидной последовательности. Таким образом, полученный рекомбинантный слитый белок представляет собой единый белок, содержащий два или несколько сегментов, которые соответствуют полипептидам, кодируемым исходными ORF (сегменты которых обычно не объединены в природе).

"Перекрестное сшивание", "конъюгирование", "присоединять", "присоединение" и "присоединенный к" используются в данном описании взаимозаменяемо и относятся к ковалентному присоединению двух разных молекул в результате химической реакции. Перекрестное сшивание может происходить в результате одной или более химических реакций, которые известны в данной области техники.

Термин "партнер конъюгирования", использованный в данном описании, относится к отдельным компонентам, которые могут быть присоединены друг к другу или являются присоединенными в результате реакции конъюгирования.

Подразумевается, что термин "конъюгат" (используемый как существительное) относится к гетерогенной молекуле, образованной в результате ковалентного присоединения одного из партнеров конъюгирования к другому, например, в случае ковалентного присоединения связывающего домена к отделяемому сегменту.

"Кросслинкер" и "сшивающий агент" используются взаимозаменяемо и в своем самом широком контексте применяются для обозначения химической единицы, используемой для ковалентного присоединения двух или более единиц друг к другу. Например, кросслинкер соединяет два, три, четыре или более пептидов или соединяет пептид с XTEN. Специалисту в данной области техники будет понятно, что термин "кросслинкер" может относиться к продукту реакции ковалентного связывания, остающемуся после перекрестного сшивания реагентов. Кросслинкер также может содержать один или более реагентов, которые еще не вступали в реакцию, но которые способны взаимодействовать с другой единицей.

В контексте полипептидов "линейная последовательность" или "последовательность" представляет собой порядок аминокислот в полипептиде в направлении от амино- к карбоксильному концу (от N- к C-концу), при этом остатки, которые примыкают друг к другу в такой последовательности, называются смежными в первичной структуре полипептида. "Частичная последовательность" представляет собой линейную последовательность части полипептида, которая, как известно, содержит дополнительные остатки в одном или обоих направлениях.

Термин "гетерологичный" означает происходящий из структуры, генотипически отличающейся от остальной части структуры, с которой осуществляют сравнение. Например, обогащенная остатками глицина последовательность, извлеченная из своей нативной, кодирующей последовательности и функционально связанная с кодирующей последовательностью, отличающейся от нативной последовательности, представляет собой гетерологичную обогащенную остатками глицина последовательность. Термин "гетерологичный" в применении к полинуклеотиду, полипептиду, означает, что полинуклеотид или полипептид происходит из структуры, генотипически отличающейся от остальной части структуры, с которой осуществляют сравнение.

Термины "полинуклеотиды", "нуклеиновые кислоты", "нуклеотиды" и "олигонуклеотиды" используются взаимозаменяемо. Они относятся к нуклеотидам любой длины, охватывая отдельную нуклеиновую кислоту, а также множественные нуклеиновые кислоты, либо дезоксирибонуклеотидам, либо рибонуклеотидам или их аналогам. Полинуклеотиды могут иметь любую пространственную структуру и могут осуществлять любую функцию, известную или неизвестную. Далее приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие участки гена или фрагмента гена, локусы

(локус), определенные(ый) из анализа сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеиново-кислотные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги. Если присутствуют, модификации нуклеотидной структуры могут быть введены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть "прервана" ненуклеотидными компонентами. После полимеризации полинуклеотид может быть подвергнут дальнейшей модификации, как например, путем конъюгирования с применяемым для мечения компонентом.

Термин "комплементарная полинуклеотид" означает молекулу полинуклеотида, имеющую комплементарную последовательность оснований и обратную ориентацию по сравнению со ссылкой последовательностью, вследствие чего она может гибридизоваться со ссылкой последовательностью с абсолютной точностью.

"Рекомбинантный" в применении к полинуклеотиду означает, что полинуклеотид представляет собой результат различных комбинаций стадий рекомбинации, которые могут включать стадии клонирования, обработки рестриктазами и/или лигирования и другие методики, в результате которых осуществляется экспрессия рекомбинантного белка в клетке-хозяине.

Термины "ген" и "фрагмент гена" используются в данном описании взаимозаменяемо. Они относятся к полинуклеотиду, содержащему по меньшей мере одну открытую рамку считывания, который способен кодировать конкретный белок после осуществления его транскрипции и трансляции. Ген или фрагмент гена может представлять собой геномную или кДНК если только полинуклеотид содержит по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая может охватывать весь кодирующий участок или его сегмент. "Слитый ген" представляет собой ген, составленный по меньшей мере из двух гетерологичных полинуклеотидов, которые соединены друг с другом.

Как использовано в данном описании, "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" представляет собой часть полинуклеотида, который состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Несмотря на то, что "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) обычно не транслируется в аминокислоту, его можно считать частью кодирующей области, а любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны и тому подобное, не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области обычно определяют по стартовому кодону на 5'-конце, кодирующему аминоконец полученного полипептида, и стоп-кодону трансляции на 3'-конце, кодирующему карбоксильный конец полученного полипептида. Две или несколько кодирующих областей по настоящему изобретению могут быть представлены в единой полинуклеотидной конструкции, например, в одном и том же векторе, или в разных полинуклеотидных конструкциях, например, в отдельных (различных) векторах. Тогда из этого следует, что один вектор может содержать только одну кодирующую область или может содержать две или несколько кодирующих областей, например, один вектор может по отдельности кодировать связывающий домен-А и связывающий домен-В, как описано ниже. Помимо этого, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота по изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий домен по изобретению. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничения, специальные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Термин "в прямом направлении" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в 3'-направлении по отношению к референсной нуклеотидной последовательности. В некоторых воплощениях расположенные в прямом направлении нуклеотидные последовательности означают последовательности, которые следуют за стартовой точкой транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен в прямом направлении по отношению к стартовому сайту транскрипции.

Термин "в обратном направлении" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в 5'-направлении по отношению к референсной нуклеотидной последовательности. В некоторых воплощениях расположенные в обратном направлении нуклеотидные последовательности означают последовательности, которые расположены с 5'-стороны кодирующей области или стартовой точки транскрипции. Например, большинство промоторов расположены в обратном направлении по отношению к стартовому сайту транскрипции.

Термин "гомология" или "гомологичные" относится к сходству или взаимозаменяемости последовательностей между двумя или более полинуклеотидными последовательностями или между двумя или более полипептидными последовательностями. При использовании такой программы, как BestFit, для определения идентичности последовательностей, сходства или гомологии между двумя разными аминокислотными последовательностями, можно использовать настройки по умолчанию, либо для оптимизации баллов за идентичность, сходство или гомологию можно выбрать соответствующую матрицу баллов, такую как blosum45 или blosum80. Предпочтительно, полинуклеотидами, которые считаются гомологичными, являются такие, которые гибридизуются в жестких условиях, определенных в данном описании, и имеют по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по мень-

шей мере 90%, более предпочтительно 95%, более предпочтительно 97%, более предпочтительно 98% и даже более предпочтительно 99% идентичность последовательности по сравнению с такими последовательностями. Полипептиды, которые являются гомологичными, предпочтительно имеют последовательности, которые по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, даже более предпочтительно по меньшей мере на 90%, даже более предпочтительно по меньшей мере на 95-99% идентичны в случае оптимального выравнивания с последовательностями сопоставимой длины.

"Лигирование" в применении к полинуклеиновым кислотам относится к процессу образования фосфодиэфирных связей между двумя фрагментами нуклеиновых кислот или генами, соединяющих их между собой. Чтобы произошло лигирование фрагментов ДНК или генов друг с другом, концы ДНК должны быть совместимы друг с другом. В некоторых случаях эти концы будут непосредственно совместимы после расщепления эндонуклеазой. Однако может потребоваться сначала преобразовать ступенчатые концы, обычно образующиеся после расщепления эндонуклеазами, в тупые концы, чтобы сделать их совместимыми для лигирования.

Термины "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" включают в себя ссылку на условия, при которых полинуклеотид будет гибридизоваться со своей последовательностью-мишенью в значительно большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза по сравнению с фоном). Как правило, жесткость гибридизации выражают отчасти со ссылкой на температуру и концентрацию соли, при которых осуществляют стадию промывки. Обычно жесткие условия будут такими, при которых концентрация соли составляет менее примерно 1,5 М по иону Na, обычно от примерно 0,01 до 1,0 М концентрации по иону Na (или других солей), при pH 7,0-8,3 и температуре по меньшей мере примерно 30°C для коротких полинуклеотидов (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере примерно 60°C для длинных полинуклеотидов (например, более чем 50 нуклеотидов), например, "жесткие условия" могут включать гибридизацию в 50%-ном формамиде, с 1 М NaCl, 1% SDS, при 37°C и три промывки в течение 15 мин каждая в смеси 0,1×SSC (раствор хлорида и цитрата натрия)/1% SDS при температуре от 60 до 65°C. Альтернативно, можно использовать температуры, составляющие примерно 65, 60, 55 или 42°C. Концентрация SSC может варьировать от примерно 0,1 до 2×SSC, при этом SDS присутствует в концентрации примерно 0,1%. Температуры таких промывок обычно выбирают такими, чтобы они были примерно на 5-20°C ниже термической точки плавления ($T_{пл}$) для определенной последовательности при определенных ионной силе и pH. $T_{пл}$ представляет собой температуру (в условиях определенных ионной силы и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуется с полностью совпадающим зондом. Уравнение для вычисления $T_{пл}$ и условия для гибридизации нуклеиновых кислот хорошо известны, и их можно найти в Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3^е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Обычно для блокирования неспецифической гибридизации используют блокирующие реагенты. Такие блокирующие реагенты включают, например, разрезанную и денатурированную ДНК из молок лосося в концентрации примерно 100-200 мкг/мл. В конкретных обстоятельствах, например, для процедур гибридизации РНК:ДНК, также может быть использован органический растворитель, такой как формамид в концентрации примерно 35-50% (об./об.). Полезные варианты таких условий промывки будут легко понятны специалисту средней квалификации в данной области техники.

Термины "процент идентичности", "процент идентичности последовательностей" и "% идентичности", в применении к полинуклеотидным последовательностям, относятся к процентной доли совпадений остатков между по меньшей мере двумя полинуклеотидными последовательностями, выравненными с использованием стандартизированного алгоритма. Согласно такому алгоритму, в сравниваемые последовательности могут быть введены, стандартизированным и воспроизводимым образом, разрывы с целью оптимизации процедуры выравнивания между двумя последовательностями и, таким образом, для достижения более убедительного сравнения этих двух последовательностей. Процент идентичности может быть измерен по всей длине целой определенной полинуклеотидной последовательности или может быть измерен в пределах более короткой длины, например, в пределах длины фрагмента, выбранного из определенной полинуклеотидной последовательности большей длины, например, фрагмента, состоящего по меньшей мере из 45, по меньшей мере из 60, по меньшей мере из 90, по меньшей мере из 120, по меньшей мере из 150, по меньшей мере из 210 или по меньшей мере из 450 смежных остатков. Такие длины являются только иллюстративными, и очевидно, что любую длину фрагментов, подкрепленную последовательностями, показанными в данном описании в таблицах, на фигурах или в перечне последовательностей, можно использовать для описания длины, в пределах которой может быть измерен процент идентичности. Процент идентичности последовательностей рассчитывают путем сравнения двух оптимально выравненных последовательностей в пределах окна сравнения путем определения количества совпадающих положений (по которым в обеих полипептидных последовательностях имеются идентичные остатки), деления этого количества совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. на размер окна) и умножения результата на 100 с получением процента идентичности последовательности. Если необходимо сравнивать последовательности разной длины, то длину окна сравнения определяют по самой короткой последовательности. При расчете идентичности последовательностей

консервативные замены не учитываются.

"Процент (%) идентичность последовательности" применительно к полипептидным последовательностям, идентифицированным в данном описании, определяют как процентную долю аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам во второй, референсной полипептидной последовательности сопоставимой длины или ее части после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, разрывов, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей, что приводит тем самым к оптимальному выравниванию. Выравнивания, необходимого для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей, можно достичь различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, используя общедоступное компьютерное программное обеспечение, такое как программное обеспечение BLAST (средство поиска основного локального выравнивания), BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения оптимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Процент идентичности может быть измерен по всей длине целой определенной полипептидной последовательности или может быть измерен в пределах более короткой длины, например, в пределах длины фрагмента, выбранного из определенной полипептидной последовательности большей длины, например, фрагмента, состоящего по меньшей мере из 15, по меньшей мере из 20, по меньшей мере из 30, по меньшей мере из 40, по меньшей мере из 50, по меньшей мере из 70 или по меньшей мере из 150 смежных остатков. Такие длины являются только иллюстративными, и очевидно, что любую длину фрагментов, подкрепленную последовательностями, показанными в данном описании в таблицах, на фигурах или в перечне последовательностей, можно использовать для описания длины, в пределах которой может быть измерен процент идентичности.

Термин "частота встречаемости", использованный в контексте полинуклеотидных последовательностей, относится к степени внутренней гомологии в этой последовательности, в частности, например, частоте встречаемости идентичных нуклеотидных последовательностей заданной длины. Частоту встречаемости можно определить, например, путем анализа частоты встречаемости идентичных последовательностей.

Термин "экспрессия", использованный в данном описании, относится к процессу, посредством которого на основе полинуклеотида образуется генный продукт, например, РНК или полипептид. Он включает, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида с образованием матричной РНК (мРНК), транспортной РНК (тРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК), малой интерферирующей РНК (миРНК) или любого другого продукта в виде РНК и трансляцию мРНК с образованием полипептида. В результате экспрессии образуется "генный продукт". Как использовано в данном описании, генный продукт может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например, матричную РНК, образуемую в результате транскрипции гена, или полипептид, который транслируется на основе транскрипта. Генные продукты, описанные в данном изобретении, дополнительно включают нуклеиновые кислоты, подвергнутые посттранскрипционным модификациям, например, полиаденилированию или сплайсингу, или полипептиды, подвергнутые посттрансляционным модификациям, например, метилированию, гликозилированию, присоединению липидов, образованию ассоциатов с другими белковыми субъединицами или протеолитическому расщеплению.

Термины "вектор" или "экспрессирующий вектор" используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, предпочтительно самореплицирующейся в соответствующем хозяине, которая переносит встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева и/или между ними. Термин включает в себя векторы, функция которых заключается главным образом во введении ДНК или РНК внутрь клетки, в репликации векторов, функция которых заключается главным образом в репликации ДНК или РНК, и включает в себя экспрессирующие векторы, функция которых заключается в транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Также включены векторы, которые обеспечивают выполнение более чем одной из упомянутых выше функций. "Экспрессирующим вектором" является полинуклеотид, который при введении его в соответствующую клетку-хозяина может транскрибироваться и транслироваться с образованием полипептида(ов). "Экспрессирующая система" обычно подразумевает подходящую клетку-хозяина, содержащую экспрессирующий вектор, который может функционировать с получением желаемого продукта экспрессии.

"Устойчивость к деградации в сыворотке" в применении к полипептиду относится к способности полипептидов противостоять деградации в крови или ее компонентах, в которую обычно вовлечены протеазы в сыворотке или плазме крови. Устойчивость к деградации в сыворотке можно оценить, объединяя данный белок с сывороткой или плазмой крови человека (или мыши, крысы, собаки, обезьяны, при необходимости), обычно в диапазоне нескольких суток (например, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 суток), обычно при температуре примерно 37°C. Образцы, соответствующие этим моментам времени, можно подвергнуть вестерн-блот-анализу, при этом белок регистрируют с использованием антитела. Антитело может представлять собой антитело к метке на белке. Если белок демонстрирует единственную зону на вестерн-блоте, причем размер белка идентичен размеру введенного (в сыворотку) белка, то никакой деградации

не произошло. В этом типичном методе момент времени, когда расщеплено 50% белка, что оценивается с использованием вестерн-блоттинга или эквивалентными методами, называется периодом полудеградации белка в сыворотке или "полупериодом существования белка в сыворотке".

Термины " $t_{1/2}$ ", "период полувыведения", "период полувыведения в конечной фазе", "время полувыведения" и "полупериод существования в кровотоке" используются в данном описании взаимозаменяемо и, как использовано в данном описании, означают период полувыведения в конечной фазе, рассчитанный в виде $\ln(2)/K_{el}$. K_{el} представляет собой константу скорости выведения в конечной фазе, рассчитанную методом линейной регрессии применительно к конечному линейному участку кривой зависимости концентрации, выраженной в логарифмических координатах, от времени. Обычно период полувыведения относится к периоду времени, необходимому для того, чтобы половина количества введенного вещества, попавшего в живой организм, подверглась метаболизму или была выведена в результате нормальных биологических процессов. Если кривую выведения для заданного полипептида строят как функцию от времени, то обычно эта кривая является двухфазной и состоит из быстрой α -фазы и более длинной β -фазы. Типичный для β -фазы период полувыведения человеческого антитела из организма людей составляет 21 сутки. Период полувыведения можно измерить, используя образцы, отобранные в определенные моменты времени из любой жидкости, но наиболее часто его измеряют в образцах плазмы крови.

Термин "молекулярная масса" обычно относится к сумме атомных масс атомов, составляющих молекулу. Молекулярную массу можно определить теоретически путем суммирования атомных масс атомов, составляющих молекулу. В случае применения в контексте полипептида молекулярную массу рассчитывают путем суммирования, с учетом аминокислотного состава, значений молекулярной массы аминокислоты каждого типа в композиции или путем оценки на основании сравнения со стандартами молекулярных масс в геле после проведения электрофореза в присутствии SDS. Рассчитанная молекулярная масса молекулы может отличаться от "кажущейся молекулярной массы" молекулы, которая обычно относится к молекулярной массе молекулы, определенной одним или несколькими аналитическими методами. "Фактор кажущейся молекулярной массы" и "кажущаяся молекулярная масса" являются родственными терминами, и в случае использования в контексте полипептида эти термины относятся к степени относительного увеличения или уменьшения кажущейся молекулярной массы, демонстрируемой конкретной аминокислотной или полипептидной последовательностью. Кажущаяся молекулярная масса может быть определена, например, с использованием гель-проникающей хроматографии (SEC) или похожих методов путем сравнения со стандартами глобулярных белков, по результатам измерений в единицах "кажущихся кДа". "Фактор кажущейся молекулярной массы" представляет собой соотношение между кажущейся молекулярной массой и "молекулярной массой"; последнюю рассчитывают путем суммирования с учетом аминокислотного состава, как описано выше, или путем оценки на основании сравнения со стандартами молекулярных масс в геле после проведения электрофореза в присутствии SDS. Определение кажущейся молекулярной массы и фактора кажущейся молекулярной массы описано в патенте США с номером 8673860.

Термины "гидродинамический радиус" или "радиус Стокса" означают эффективный радиус (R_h в нм) молекулы в растворе, измеренный в предположении, что она представляет собой тело, движущееся через раствор при противодействии силы, обусловленной вязкостью раствора. Для воплощений по изобретению результаты измерений гидродинамического радиуса полипептидов XTEN коррелируют с "фактором кажущейся молекулярной массы", который является в большей степени интуитивно понятной мерой. "Гидродинамический радиус" белка влияет на скорость его диффузии в водном растворе, а также на его способность мигрировать в гелях макромолекул. Гидродинамический радиус белка определяют по его молекулярной массе, а также по его структуре, включая форму и компактность упаковки. Методы определения гидродинамического радиуса хорошо известны в данной области техники, например, с использованием гель-проникающей хроматографии (SEC), как описано в патентах США № 6406632 и 7294513. Большинство белков имеют глобулярную структуру, считающуюся самой компактной пространственной структурой, которую белок может иметь с наименьшим гидродинамическим радиусом. Некоторые белки принимают случайную и открытую, неструктурированную или "линейную" конформацию и в результате этого имеют значительно более высокое значение гидродинамического радиуса по сравнению с типичными глобулярными белками схожей молекулярной массы.

"Коэффициент диффузии" означает величину молярного потока вещества через поверхность при равном единиче градиенте концентрации в направлении, перпендикулярном плоскости поверхности. При переносе вещества в разбавленных растворах обусловленный диффузией поток задается первым законом Фика, говорящем о его зависимости только от единственного свойства взаимодействия растворенного вещества с растворителем: от коэффициента диффузии.

Термин "физиологические условия" относится к набору условий в организме живого хозяина, а также к условиям *in vitro*, включая температуру, концентрацию солей, pH, которые имитируют такие условия в живом субъекте. Было установлено множество физиологически релевантных условий для применения в анализах *in vitro*. Как правило, физиологический буфер содержит соль в физиологической концентрации и его pH подводят до нейтрального значения в диапазоне от примерно 6,5 до примерно 7,8 и

предпочтительно от примерно 7,0 до примерно 7,5. Ряд физиологических буферов приведены в Sambrook и др. (2001). Физиологически релевантные температуры изменяются от примерно 25 до примерно 38°C и предпочтительно от примерно 35 до примерно 37°C.

Подразумевается, что термин "связывающий домен", использованный в данном описании, включает в себя, в частности, категории антител или фрагменты антител, которые обладают аффинностью специфического связывания с целевым антигеном или лигандом, таким как рецепторы или антигены клеточной поверхности либо гликопротеины, олигонуклеотиды, ферментативные субстраты, антигенные детерминанты или сайты связывания, которые могут присутствовать в ткани-мишени или клетке-мишени или на их поверхности.

Термин "антитело" используется в данном описании в самом широком смысле и охватывает различные антительные структуры, включая, но не ограничиваясь этим, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител при условии, что они проявляют желаемую антиген-связывающую активность. Полноразмерные антитела могут представлять собой, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

Термин "моноклональное антитело", использованный в данном описании, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие такую популяцию, являются идентичными и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих встречающиеся в природе мутации или появляющихся в процессе приготовления препарата на основе моноклональных антител, при этом такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В противоположность препаратам на основе поликлональных антител, которые обычно включают в себя различные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате на основе моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение "моноклональное" указывает на характер антитела, получаемого по существу из гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать в смысле требования получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, предназначенные для применения в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методами, включая, но не ограничиваясь этим, метод с применением гибридомной технологии, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы с использованием трансгенных животных, содержащих локусы иммуноглобулина человека в полном объеме или их часть, при этом такие методы и другие типичные методы получения моноклональных антител известны в данной области техники или изложены в данном описании.

"Фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, содержащей часть интактного антитела и связывающейся с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются этим, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, диатела, линейные антитела, однодоменное антитело, однодоменное верблужье антитело, молекулы одноцепочечных антител (scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

"scFv" или "одноцепочечный фрагмент вариабельной области" используются в данном описании взаимозаменяемо в отношении формата фрагментов антител, содержащих вариабельные области тяжелой ("VH") и легкой ("VL") цепей или две копии VH- или VL-цепи, которые соединены друг с другом коротким гибким пептидным линкером. На самом деле scFv не является фрагментом антитела, а представляет собой слитый белок, состоящий из вариабельных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов, и легко может быть экспрессирован в функциональной форме в *E. coli*.

Термины "антиген", "целевой антиген" и "иммуноген" используются в данном описании взаимозаменяемо в отношении структуры или связывающей детерминанты, с которой антитело, фрагмент антитела или молекула на основе фрагмента антитела связывается или к которой обладает специфичностью.

Термин "эпитоп" относится к конкретному сайту на молекуле антигена, с которым связывается антитело, фрагмент антитела или связывающий домен. Эпитоп представляет собой лиганд антитела или фрагмента антитела.

Как использовано в данном описании, "CD3" или "кластер дифференцировки 3" означает антигенный комплекс CD3 на поверхности Т-клетки, который включает в себя по отдельности или в независимо объединенной форме все известные субъединицы CD3, например, CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-гамма, CD3-дзета, CD3-альфа и CD3-бета. Внеклеточные домены CD3-эпсилон, -гамма и -дельта содержат иммуноглобулиноподобный домен, поэтому считаются частью суперсемейства иммуноглобулинов.

Термины "специфичное связывание", или "специфично связывается", или "специфичность связывания" используются в данном описании взаимозаменяемо в отношении высокой степени аффинности связывания связывающего домена с соответствующей ему мишенью. Обычно, специфичное связывание по результатам измерений с использованием одного или более анализов, изложенных в данном описании, будет характеризоваться константой диссоциации или K_d, составляющей меньше чем примерно 10⁻⁶ М.

"Аффинность" относится к силе всей совокупности нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, при использовании в данном описании "аффинность связывания" относится

к собственно аффинности связывания, которая отражает взаимодействие по типу 1:1 между членами связывающейся пары (например, между антителом и антигеном). В общем случае, аффинность молекулы X по отношению к его партнеру Y может быть представлена константой диссоциации (K_d). Как использовано в данном описании, "более высокая аффинность связывания" означает более низкое значение K_d ; например, 1×10^{-9} М соответствует более высокой аффинности связывания чем 1×10^{-8} М.

Термины "константа ингибирования" или " K_i " используются взаимозаменяемо и означают константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор или величину, обратную аффинности связывания ингибитора с ферментом.

Термины "константа диссоциации" или " K_d " используются взаимозаменяемо и означают аффинность между лигандом "L" и белком "P"; т.е. насколько прочно лиганд связывается с конкретным белком. Она может быть рассчитана с использованием формулы $K_d = [L][P]/[LP]$, где [P], [L] и [LP] представляют собой молярные концентрации белка, лиганда и комплекса, соответственно. Подразумевается, что термин " k_{on} ", использованный в данном описании, относится к константе скорости ассоциации для объединения антитела с антигеном с целью образования комплекса антитело/антиген, как известно в данной области техники. Подразумевается, что термин " k_{off} ", использованный в данном описании, относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген, как известно в данной области техники.

Термин "антагонист", использованный в данном описании, включает любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, ингибирует или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида, описанного в данном изобретении. Методы идентификации антагонистов полипептида могут включать приведение в контакт нативного полипептида с молекулой-кандидатом в антагонисты и измерение детектируемого изменения одного или более видов биологической активности, в норме ассоциируемых с нативным полипептидом. В контексте настоящего изобретения антагонисты могут включать белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, антитела или какие-либо другие молекулы, которые ослабляют действие биологически активного белка.

"Маркер клетки-мишени" относится к молекуле, экспрессируемой клеткой-мишенью, включая, но не ограничиваясь этим, рецепторы клеточной поверхности, антигены, гликопротеины, олигонуклеотиды, субстраты ферментов, антигенные детерминанты или сайты связывания, которые могут присутствовать на поверхности ткани-мишени или клетки-мишени и которые могут служить в качестве лигандов для антител.

"Ткань-мишень" относится к ткани, которая является причиной или представляет собой часть болезненного состояния, такого как, но не ограничиваясь этим, рак или воспалительные состояния. Источники пораженной заболеванием ткани-мишени включают орган тела, опухоль, раковую клетку или популяцию раковых клеток либо клеток, которые образуют матрикс или обнаруживаются вместе с популяцией раковых клеток, кость, кожу, клетки, которые продуцируют цитокины или факторы, вносящие вклад в болезненное состояние.

Термин "среда определенного состава" относится к среде, содержащей дополнительные ресурсы питательных веществ и гормонов, необходимые для выживания и/или роста клеток в культуре, при этом компоненты этой среды известны. Традиционно, среда определенного состава приготовлена путем добавления питательных веществ и ростовых факторов, необходимых для роста и/или выживания. В типичном случае среда определенного состава содержит по меньшей мере один компонент, выбранный из одной или более чем одной из следующих категорий: а) все незаменимые аминокислоты и, обычно, основной набор из двадцати аминокислот с добавлением цистеина; б) источник энергии, обычно в форме углевода, такого как глюкоза; в) витамины и/или другие органические соединения, необходимые в низких концентрациях; г) свободные жирные кислоты и д) микроэлементы, причем микроэлементы по определению представляют собой неорганические соединения или природные элементы, которые в типичном случае необходимы в очень низких концентрациях, обычно в микромолярном диапазоне. Возможно, что среда определенного состава также может быть дополнена одним или более компонентами, выбранными из любой из следующих категорий: а) один или более митогенных агентов; б) соли и буферы, как, например, на основе кальция, магния и фосфата; в) нуклеозиды и основания, такие как, например, аденозин и тимидин, гипоксантин; и г) гидролизаты белков и тканей.

Термин "агонист" используется в самом широком смысле и включает любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида, описанного в данном изобретении. Подходящие агонистические молекулы, в частности, включают агонистические антитела или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотных последовательностей нативных полипептидов, пептиды, малые органические молекулы и т.д. Методы идентификации агонистов нативного полипептида могут включать приведение в контакт нативного полипептида с молекулой-кандидатом в агонисты и измерение детектируемого изменения в анализе биологической активности одного или более видов, в норме ассоциируемых с нативным полипептидом.

Использованные в данном описании термины "лечение", или "лечить", или "временное облегчение", или "уменьшение интенсивности симптомов" применяются в данном описании взаимозаменяемо. Эти термины относятся к подходу для получения благоприятных или желаемых результатов, включая, но не

ограничиваясь этим, терапевтическую пользу и/или профилактическую пользу. Под терапевтической пользой понимают ликвидацию или уменьшение интенсивности симптомов основного расстройства, подвергаемого лечению. Кроме того, терапевтическая польза достигается при ликвидации или уменьшении интенсивности одного или нескольких физиологических симптомов либо улучшении одного или нескольких клинических параметров, ассоциированных с основным расстройством, при этом у субъекта наблюдается улучшение несмотря на то, что этот субъект все еще может быть поражен основным расстройством. Для получения профилактической пользы данные композиции можно вводить субъекту с риском развития конкретного заболевания или субъекту, у которого зарегистрированы один или несколько физиологических симптомов заболевания, даже в том случае, если диагноз этого заболевания возможно не поставлен.

"Терапевтический эффект" или "терапевтическая польза", как использовано в данном описании, относится к физиологическому эффекту, включая, но не ограничиваясь этим, ослабление, уменьшение интенсивности симптомов или предупреждение заболевания либо улучшение одного или нескольких клинических параметров, ассоциированных с основным расстройством, у людей или других животных, либо к иному улучшению физического или психического самочувствия у людей или животных, обусловленному введением полипептида по изобретению, отличающемуся от способности индуцировать образование антитела к эпитопу антигена, улучшению, приобретаемому посредством биологически активного белка. Для получения профилактической пользы данные композиции можно вводить субъекту с риском развития конкретного заболевания, возникновения рецидива предшествующего заболевания, состояния или симптома этого заболевания либо субъекту, у которого зарегистрированы один или несколько физиологических симптомов заболевания, даже в том случае, если диагноз этого заболевания возможно не поставлен.

Термины "терапевтически эффективное количество" и "терапевтически эффективный доза", использованные в данном описании, относятся к количеству лекарственного средства или биологически активного белка, либо самого по себе, либо в виде части полипептидной композиции, которая может оказывать любой детектируемый благоприятный эффект на любой симптом, аспект, измеряемый параметр или характерные особенности болезненного состояния или заболевания при введении субъекту в виде одной дозы или в виде повторных доз. Такой эффект не обязательно должен быть абсолютно благоприятным. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах компетентности специалистов в данной области техники, особенно с учетом подробного описания, приведенного в данном изобретении.

Термин "терапевтически эффективная и нетоксичная доза", использованный в данном описании, относится к переносимой дозе композиций, определенных в данном описании, которая является достаточно высокой, чтобы вызвать истощение опухолевых или раковых клеток, устранение опухоли, уменьшение размеров опухоли или стабилизацию заболевания без или по существу без значительных токсических эффектов у субъекта. Такие терапевтически эффективные и нетоксичные дозы могут быть определены в результате исследований с возрастанием дозы, описанных в данной области техники, и они должны быть ниже дозы, вызывающей тяжелые неблагоприятные побочные эффекты.

Термин "режим введения доз", использованный в данном описании, относится к схеме для последовательно вводимых многократных доз (т.е. по меньшей мере двух или больше) композиции, при этом дозы назначают в терапевтически эффективных количествах для получения в результате устойчивого благоприятного влияния на любой симптом, аспект, измеряемый параметр, конечный показатель или характерную особенность болезненного состояния или заболевания.

Термины "рак" и "раковый" относятся к физиологическим состояниям или описывают таковые у млекопитающих, которые обычно характеризуются нерегулируемым ростом/нерегулируемой пролиферацией клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются этим, карциномы, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, бластому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак головы и шеи, любую форму рака кожи, меланому, рак мочеполовых путей, рак яичника, рак яичника со злокачественным асцитом, перитонеальный карциноматоз, серозную карциному матки, рак эндометрия, рак шейки матки, колоректальный рак, эпителиальное внутрибрюшинное новообразование со злокачественным асцитом, рак матки, мезотелиому в брюшной полости, раковые заболевания почки, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочный рак, рак пищевода, рак желудка, рак тонкого кишечника, рак печени, гепатокарциному, гепатобластому, липосаркому, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, эпителиальный рак, аденокарциному, саркомы любого происхождения, первичные гематологические злокачественные новообразования, включая острый или хронический лимфоцитарные лейкозы, острый или хронический миелогенные лейкозы, миелопролиферативное опухолевое заболевание или миелодиспластические расстройства, тяжелую миастению, Базедову болезнь, тиреоидит Хашимото или синдром Гудпасчера.

Термин "опухолеспецифический маркер", использованный в данном описании, относится к антигену, который обнаруживается на поверхности раковой клетки или в раковой клетке, который может быть

обнаружен, но это не является необходимым, в больших количествах в раковой клетке или на ее поверхности по сравнению с нормальными клетками или тканями.

"Клетка-мишень" относится к клетке, которая имеет лиганд антитела или фрагмента антитела заявленных композиций и ассоциирована с заболеванием или патологическим состоянием либо вызывает заболевание или патологическое состояние, в том числе к раковым клеткам, опухолевым клеткам и воспалительным клеткам. Лиганд клетки-мишени обозначается в данном описании как "маркер клетки-мишени" или "антиген клетки-мишени" и включает, но не ограничивается этим, рецепторы или антигены клеточной поверхности, цитокины, белки МНС и белки или пептиды из цитозоля, которые представлены экзогенно. Используемый в данном описании термин "клетка-мишень" не будет включать в себя эфektorную клетку.

I. Общие методы

При практическом применении настоящего изобретения используются, если не указано иное, традиционные методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, геномики и рекомбинантной ДНК, которые известны специалисту в данной области техники. См. Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; "Current protocols in molecular biology", F. M. Ausubel, et al. eds., 1987; серию "Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA.; "PCR 2: a practical approach", M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., Oxford University Press, 1995; "Antibodies, a laboratory manual", Harlow, E. and Lane, D. eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 11th Edition, McGraw-Hill, 2005; и Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", 4th edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000, содержания которых включены в данное описание во всей своей полноте посредством ссылки.

Клетки-хозяева можно культивировать в различных средах. Имеющиеся в продаже среды, такие как среда F10 Хэма (Sigma), минимальная поддерживающая среда (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM, Sigma), подходят для культивирования эукариотических клеток. Помимо этого, клетки животных могут расти в среде определенного состава, в которой отсутствует сыворотка крови, но которая дополнена гормонами, факторами роста или любыми другими факторами, необходимыми для выживания и/или роста клеток конкретного типа. Ввиду того, что среда определенного состава, поддерживающая клеточное выживание, обеспечивает жизнеспособность, морфологическую особенность, способность к метаболизму и, возможно, способность клетки к дифференцировке, среда определенного состава, стимулирующая клеточный рост, обеспечивает все химические реагенты, необходимые для пролиферации или размножения клеток. Общие параметры, обуславливающие выживание и рост клеток млекопитающих *in vitro*, являются общепринятыми в данной области техники. Физико-химическими параметрами, которые можно регулировать в разных системах для культивирования клеток, являются, например, pH, рО₂, температура и осмолярность. Потребность клеток в питательных веществах обычно предусмотрена в композициях стандартных сред, разработанных для обеспечения оптимальных условий. Питательные вещества можно разделить на несколько категорий: аминокислоты и их производные, углеводы, сахара, жирные кислоты, сложные липиды, производные нуклеиновых кислот и витамины. Наряду с питательными веществами для поддержания клеточного метаболизма большинство клеток также испытывает потребность в одном или более гормонах по меньшей мере одной из следующих групп: стероиды, простагландины, факторы роста, гипофизарные гормоны и пептидные гормоны, чтобы осуществлять пролиферацию в бессывороточных средах (Sato G.H. и др. в "Growth of Cells in Hormonally Defined Media", Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1982). Помимо гормонов, клеткам могут потребоваться транспортные белки, такие как трансферрин (транспортный белок для переноса ионов железа плазмы крови), церулоплазмин (транспортный белок для переноса ионов меди) и липопротейн высокой плотности (липидный носитель) для выживания и роста *in vitro*. Набор оптимальных гормонов или транспортных белков будет варьировать для каждого клеточного типа. Большая часть этих гормонов или транспортных белков добавлена экзогенно или, в редком случае, бывает обнаружена мутантная клеточная линия, для которой не требуется конкретного фактора. Специалистам в данной области техники будут известны другие факторы, необходимые для поддержания клеточной культуры без излишнего экспериментирования.

Ростовые среды для роста прокариотических клеток-хозяев включают питательные бульоны (жидкую питательную среду) или LB среду (лизогенная среда) (Лурия-Бертани). Подходящие среды включают среды определенного и неопределенного составов. В общем случае, среда содержит источник углерода, такой как глюкоза, необходимый для роста бактерий, воду и соли. Среда также может включать источник аминокислот и азота, например, мясной или дрожжевой экстракт (в среде неопределенного состава), или аминокислоты в известных количествах (в среде определенного состава). В некоторых воплощениях ростовой средой является LB бульон, например, LB бульон Миллера или LB бульон Леннокса. LB бульон содержит пептон (продукт ферментативного расщепления казеина), дрожжевой экстракт и хлорид натрия. В некоторых воплощениях используется селективная среда, которая содержит антибиотик. В этой среде будут расти только желаемые клетки, обладающие устойчивостью к данному антибиотику.

II. Композиции химерного полипептидного комплекса

Помимо всего прочего, настоящее изобретение относится к композициям химерного полипептидного комплекса (также называемого как "ProTIA"), полезным в лечении, уменьшении интенсивности симптомов или предупреждении заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, раковые заболевания, аутоиммунные или воспалительные нарушения.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, обычно содержащий первую часть, вторую часть и третью часть, при этом: указанная первая часть содержит (1) первый связывающий домен со специфичностью связывания с маркером клетки-мишени; и (2) второй связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки; указанная вторая часть содержит пептидильный отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться одной или несколькими протеазами млекопитающих; и указанная третья часть содержит объемную группировку; при этом указанная объемная группировка способна отделяться от указанной первой части под действием указанной протеазы млекопитающих на указанную вторую часть. Без привязки к теории отметим, что типичный полипептидный комплекс по настоящему изобретению демонстрирует один или более из следующих признаков: 1) этот комплекс содержит по меньшей мере два связывающих домена, обладающих способностью одновременно связываться с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью; 2) этот комплекс содержит объемную группировку, которая (а) экранирует связывающие домены и снижает аффинность связывания с целевыми антигенами, когда композиция находится в интактном состоянии, посредством, например, стерических затруднений, (б) обеспечивает достижение более продолжительного периода полувыведения композиции при введении субъекту и/или (в) ослабляет экстравазацию композиции из сосудистой системы в нормальные ткани и органы по сравнению с экстравазацией в пораженные заболеванием ткани (например, опухоли), что приводит к получению улучшенного профиля безопасности по сравнению с терапевтическими средствами на основе биспецифичных цитотоксических антител, в настоящее время применяемых или оцениваемых в клинических испытаниях; и 3) этот комплекс способен расщепляться одной или несколькими протеазами млекопитающих, при нахождении в непосредственной близости от пораженных заболеванием тканей, таких как опухолевая или воспаленная ткань, с высвобождением тем самым связывающих доменов первой части, вследствие чего связывающие домены могут связываться с маркером клетки-мишени и антигеном эффекторной клетки с более высокой аффинностью по сравнению с состоянием, когда связывающие домены не отщеплены от комплекса. Заявленный комплекс предпочтительно может действовать в качестве "пролекарства" в том смысле, что терапевтическая часть (например, первая часть, способная "заставить" клетку-мишень и эффекторную клетку быть вместе) высвобождается в месте локализации пораженной заболеванием ткани, в которой эта протеаза предпочтительно экспрессируется по сравнению с нормальными тканями. Заявленный комплекс направлен на преодоление некоторых выраженных недостатков существующих биспецифичных антител, в том числе BiTE®. При использовании заявленного комплекса обычно сохраняется известный терапевтический эффект, выражаемый в уменьшении размеров опухоли под действием биспецифичных антител, таких как BiTE®, но в то же время ослабляются побочные эффекты, свойственные традиционным биспецифичным антителам. В одном из воплощений изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, в которых первая часть содержит два связывающих домена в одноцепочечном формате, при этом первый связывающий домен обладает специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, а второй связывающий домен обладает специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки, таким как рецептор на поверхности или лиганд внутри эффекторной клетки, благодаря чему такая композиция считается биспецифичной.

В некоторых воплощениях конструкция заявленных композиций является такой, что под действием протеазы расщепляется отделяемый сегмент (RS) заявленных композиций, посредством чего из композиции высвобождаются связывающие домены и объемная группировка. В результате высвобождения из композиции первый связывающий домен со специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и второй связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки способны одновременно связывать, с большей аффинностью связывания, чем у интактной композиции, и соединять друг с другом эффекторную клетку и клетку-мишень, образуя иммунологический синапс, с получением того результата, что при очень низких отношениях эффектора к мишени (Е:Т) на клетку-мишень воздействуют эффекторные молекулы, высвобожденные эффекторной клеткой в пространство иммунологического синапса между этими клетками, вызывая повреждение клетки-мишени, в том числе, но не ограничиваясь этим, перфорин-опосредуемый лизис, индуцированную гранзимом В клеточную гибель и/или апоптоз. В некоторых воплощениях высвободившаяся первая часть заявленных композиций сконструирована с такими специфичностями связывания, что она обладает способностью одновременно связываться с представляющими собой эффекторные клетки цитотоксичными Т-лимфоцитами и предварительно выбранными поверхностными антигенами на опухолевых клетках у субъекта, тем самым образуется иммунологический синапс и осуществляется селективное, направленное и локализованное действие высвободившихся цитокинов и эффекторных молекул против опухоли-мишени, с получением того результата, что опухолевые клетки повреждаются или разрушаются, что вы-

ражается в противоопухолевом действии и терапевтической пользе для субъекта. В других воплощениях эффекторная клетка, связанная высвободившейся первой частью, представляет собой клетку, выбранную из группы, состоящей из плазматической клетки, В-клетки, цитокин-индуцируемой киллерной клетки (СПС клетки), тучной клетки, дендритной клетки, регуляторной Т-клетки (RegT-клетки), хелперной Т-клетки, миелоидной клетки и NK клетки.

Согласно другому аспекту изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие первую часть, вторую часть, третью часть, четвертую часть и пятую часть, при этом первая часть содержит первый и второй связывающие домены (описанные более подробно ниже), вторая часть содержит отделяемый сегмент (RS), третья часть содержит объемную группировку (описанную более подробно ниже), четвертая часть содержит отделяемый сегмент (RS), который может быть таким же, что и RS во второй части, или может отличаться от него, и пятая часть содержит объемную группировку, которая может быть такой же или может отличаться от объемной группировки третьей части; при этом такая композиция находится по существу в форме пролекарства до момента ее активации протеазой.

Данные композиции направлены на преодоление давно испытываемой потребности в разработке биспецифичных терапевтических средств, которые имеют более высокую селективность, более продолжительный период полувыведения и оказывают слабое токсическое действие и меньшее количество побочных эффектов, когда они расщеплены протеазами, обнаруживаемыми в ассоциированных с мишенью тканях или тканях, ставших нездоровыми в результате заболевания, вследствие чего заявленные композиции имеют улучшенный терапевтический индекс по сравнению с композициями на основе биспецифичных антител, известными в данной области техники. Такие композиции полезны в лечении некоторых заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, рак.

1. Связывающие домены.

Цель изобретения заключается в разработке композиций химерного полипептидного комплекса, содержащих первую часть, содержащую по меньшей мере первый связывающий домен со специфичностью связывания с маркером клетки-мишени (например, опухолеспецифическим маркером), и второй связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки. В некоторых воплощениях связывающие домены соединены в единую цепь, демонстрирующую биспецифичность связывания в отношении маркера клетки-мишени и антигена эффекторной клетки.

Согласно другому аспекту цель изобретения заключается в разработке расщепляемых композиций химерного полипептидного комплекса, сконструированных в конфигурациях, где связывающие домены первой части присоединены к объемной группировке коротким пептидным отделяемым сегментом, содержащим расщепляемую последовательность. В такой типичной конфигурации связывающие домены экранированы компонентом(ами) проксимальной объемной группировки с целью ослабления или устранения неспецифичных взаимодействий и связывания с не пораженными заболеванием тканями или клетками, которые не являются предполагаемыми мишенями для композиций, что снижает тем самым нежелательную токсичность или побочные эффекты. В дополнение к этому, экранирующая объемная группировка высвобождается в целевом месте (например, в пораженной заболеванием ткани) в результате расщепления отделяемого сегмента протеазой (описанной более подробно ниже), которая предпочтительно экспрессируется в такой пораженной заболеванием ткани. Затем высвободившаяся первая часть восстанавливает свою способность более полно или с большей avidностью связываться с соответствующими лигандами, включая маркер клетки-мишени и маркер эффекторной клетки. Без связи с какой-либо конкретной теорией, отметим, что заявленный химерный полипептидный комплекс обеспечивает многочисленные преимущества как терапевтическое средство с точки зрения снижения частоты введения, увеличения продолжительности терапевтического эффекта и снижения тяжести выявленных при постановке диагноза побочных эффектов у субъекта по сравнению с побочными эффектами в результате или после введения сопоставимой дозы, в ммоль/кг, композиции, содержащей только биспецифично связывающие домены первой части. Неограничивающие примеры побочных эффектов, которые предотвращаются или ослабляются в результате применения заявленных композиций, включают нежелательные увеличения уровней IL-2, TNF-альфа, IFN-гамма, ферментов печени в плазме крови и/или числа случаев сепсиса, фебрильной нейтропении, нейротоксичности, судорог, энцефалопатии, синдрома высвобождения цитокинов, расстройства речи, нарушения равновесия, лихорадки, головной боли, спутанности сознания, гипотензии, нейтропении, тошноты, нарушенного сознания и дезориентирования.

Данное изобретение предполагает применение одноцепочечных связывающих доменов для использования в заявленных композициях, таких как, но не ограничиваясь этим, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, линейные антитела, однодоменное антитело, однодоменное верблужье антитело, молекулы одноцепочечных антител (scFv) и диатела, способные связываться с лигандами или рецепторами, ассоциированными с эффекторными клетками, и антигенами пораженных заболеванием тканей или клеток, которые представляют собой разновидности рака, опухоли или другие злокачественные ткани. В других воплощениях первый и второй связывающие домены первой части композиций химерного полипептидного комплекса могут представлять собой "неантительные" каркасы, такие как антикарины, аднектины, финомеры, аффилины, аффитела, центирины, DARPin. В других воплощениях доменом, связывающимся с

опухолевой клеткой-мишенью, является переменный домен Т-клеточного рецептора, который был сконструирован для связывания с МНС, несущим пептидный фрагмент белка, который сверхэкспрессируется опухолевыми клетками. Композиции по настоящему изобретению разработаны с учетом локализации протеазы ткани-мишени, а также присутствия такой же протеазы в здоровых тканях, не предназначенных для направленного на них воздействия, а также присутствия целевого лиганда в здоровой ткани, но в более высокой степени данного лиганда в нездоровой ткани-мишени, с целью обеспечения широкого терапевтического окна. Термин "терапевтическое окно" относится к наибольшей разнице между минимальной эффективной дозой и максимальной переносимой дозой для заданной терапевтической композиции. Чтобы способствовать достижению широкого терапевтического окна, связывающие домены первой части композиций экранируют располагающейся вблизи объемной группировкой (например, XTEN), вследствие чего аффинность связывания интактной композиции с одним или обоими лигандами снижается по сравнению с композицией, которая претерпела расщепление под действием протеазы млекопитающих с освобождением первой части от экранирующих эффектов объемной группировки.

Применительно к одноцепочечным связывающим доменам, как хорошо установлено, Fv представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания антигена и связывания с ним; при этом Fv состоит из димера, составленного из одного переменного домена тяжелой (VH) и одного переменного домена легкой цепи (VL), соединенных посредством нековалентных взаимодействий. В составе каждой из VH- и VL-цепей имеются три определяющих комплементарность участка (CDR), взаимодействие с которыми определяет антигенсвязывающий сайт на поверхности димера VH-VL; шесть CDR связывающего домена придают антигенсвязывающую специфичность антителу или одноцепочечному связывающему домену. В некоторых случаях создают scFv, при этом каждый имеет 3, 4 или 5 CDR в пределах каждого связывающего домена. Каркасные последовательности, фланкирующие CDR, имеют третичную структуру, которая является по существу межвидовой консервативной последовательностью в нативных иммуноглобулинах, а каркасные остатки (FR) служат для поддержания CDR в их соответствующей ориентации. Для выполнения связывающей функции не требуется присутствия константных доменов, но они могут способствовать стабилизации взаимодействия VH-VL. Домен сайта связывания полипептида по изобретению может представлять собой пару VH-VL-, VH-VH- или VL-VL-доменов либо одного и того же, либо разных иммуноглобулинов, однако обычно предпочтительнее создавать одноцепочечные связывающие домены, используя соответствующие VH- и VL-цепи из родительского антитела. Порядок расположения VH-и VL-доменов в полипептидной цепи не является ограничением для настоящего изобретения; порядок расположения данных доменов может быть изменен на противоположный обычно без какой-либо потери функции, но очевидно, что VH- и VL-домены располагаются так, чтобы антигенсвязывающий сайт мог свернуться надлежащим образом. Таким образом, одноцепочечные связывающие домены биспецифичных scFv-содержащих воплощений заявленных композиций могут располагаться в таком порядке (VL-VH)1-(VL-VH)2, где "1" и "2" представляют собой первый и второй связывающие домены, соответственно, или (VL-VH)1-(VH-VL)2, или (VH-VL)1-(VL-VH)2, или (VH-VL)1-(VH-VL)2, при этом парные связывающие домены соединены полипептидным линкером, который описан в данном изобретении ниже.

Таким образом, относительное расположение связывающих доменов в составе типичного биспецифичного одноцепочечного антитела, описанного в данном изобретении, может быть таким, в котором первый связывающий домен локализован С-терминально относительно второго связывающего домена. Относительное расположение V цепей может быть таковым: VH(поверхностный антиген клетки-мишени)-VL(поверхностный антиген клетки-мишени)-VL(антиген эффекторной клетки)-VH(антиген эффекторной клетки), VH(поверхностный антиген клетки-мишени)-VL(поверхностный антиген клетки-мишени)-VH(антиген эффекторной клетки)-VL(антиген эффекторной клетки), VL(поверхностный антиген клетки-мишени)-VH(поверхностный антиген клетки-мишени)-VL(антиген эффекторной клетки)-VH(антиген эффекторной клетки) или VL(поверхностный антиген клетки-мишени)-VH(поверхностный антиген клетки-мишени)-VH(антиген эффекторной клетки)-VL(антиген эффекторной клетки). Для относительного расположения, в котором второй связывающий домен локализован N-терминально относительно первого связывающего домена, возможны следующие порядки расположения: VH(антиген эффекторной клетки)-VL(антиген эффекторной клетки)-VL(поверхностный антиген клетки-мишени)-VH(поверхностный антиген клетки-мишени), VH(антиген эффекторной клетки)-VL(антиген эффекторной клетки)-VH(поверхностный антиген клетки-мишени)-VL(поверхностный антиген клетки-мишени), VL(антиген эффекторной клетки)-VH(антиген эффекторной клетки)-VL(поверхностный антиген клетки-мишени)-VH(поверхностный антиген клетки-мишени) или VL(антиген эффекторной клетки)-VH(антиген эффекторной клетки)-VH(поверхностный антиген клетки-мишени)-VL(поверхностный антиген клетки-мишени). Как использовано в данном описании, "N-терминально" или "С-терминально" и их грамматические варианты означают относительное расположение в пределах первичной аминокислотной последовательности, а не размещение точно на N- или С-конце биспецифичного одноцепочечного антитела. Следовательно, в качестве неограничивающего примера, первый связывающий домен, который "локализован С-терминально относительно второго связывающего домена" означает, что первый связывающий домен локализован со стороны карбоксильной группировки второго связывающего домена в пределах

биспецифичного одноцепочечного антитела, и что это не исключает возможности локализации дополнительной последовательности, например, His-метки или другого соединения, например, содержащего радиоактивный изотоп, на С-конце биспецифичного одноцепочечного антитела.

В одном из воплощений композиции химерного полипептидного комплекса содержат первую часть, содержащую первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом каждый из указанных связывающих доменов представляет собой scFv и при этом каждый scFv содержит одну VL-область и одну VH-область. В другом воплощении композиции химерного полипептидного комплекса содержат первую часть, содержащую первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом указанные связывающие домены находятся в конфигурации диатела и при этом каждый домен содержит одну VL-область и одну VH-область. В упомянутых выше воплощениях первый домен обладает специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, а второй связывающий домен обладает специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки. В одном из упомянутых выше воплощений антиген эффекторной клетки экспрессируется на поверхности или внутри эффекторной клетки. В одном из воплощений антиген эффекторной клетки экспрессируется на Т-клетке, такой как CD4+, CD8+ или природная киллерная (NK) клетка. В другом воплощении антиген эффекторной клетки экспрессируется на В-клетке, тучной клетке, дендритной клетке или миелоидной клетке. В одном из воплощений антиген эффекторной клетки представляет собой CD3, антиген кластера дифференцировки 3 цитотоксической Т-клетки. В некоторых воплощениях из указанных выше первый связывающий домен демонстрирует специфичность связывания с опухолеспецифическим маркером, ассоциированным с опухолевой клеткой. В одном из воплощений связывающий домен обладает аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, при этом опухолевая клетка может включать, без ограничения, клетки стромально-клеточной опухоли, фибробластной опухоли, миофибробластической опухоли, опухоли, происходящей из глиальных клеток, эпителиоидно-клеточной опухоли, липоидно-клеточной опухоли, опухоли, происходящей из иммунных клеток, опухоли, происходящей из клеток сосудов, и опухоли, происходящей из гладкомышечных клеток. В одном из воплощений опухолеспецифический маркер или антиген клетки-мишени выбран из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцина), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-О-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), сигнализированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротейна (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. В одном из воплощений первый связывающий домен, который демонстрирует аффинность связывания с CD70, представляет собой его природный лиганд, CD27, скорее чем фрагмент антитела. В другом воплощении первый связывающий домен, который демонстрирует аффинность связывания с B7-H6, представляет собой его природный лиганд, Nkp30, скорее чем фрагмент антитела.

Предусматривается, что scFv-содержащие воплощения заявленных композиций по изобретению содержат первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом VL- и VH-домены происходят из моноклональных антител, обладающих специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и антигенами эффекторных клеток, соответственно. В других случаях и первый, и второй связывающие домены, каждый содержит шесть CDR, происходящих из моноклональных антител, обладающих специфичностью связывания с маркером клетки-мишени, таким как опухолеспецифический маркер, и антигенами эффекторных клеток, соответственно. В других воплощениях первый и второй связывающие домены первой части заявленных композиций могут иметь 3, 4 или 5 CDR в пределах каждого связывающего домена. В других случаях воплощения по изобретению содержат первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом каждый из них содержит участок CDR-H1, участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, при этом каждый из указанных участков происходит из моноклонального антитела, способного связываться с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и антигенами эффекторных клеток, соответственно. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, при этом второй связывающий домен содержит VH- и VL-области, происходящие из моноклонального антитела, способного связываться с CD3 человека. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, в которой второй связывающий домен scFv содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по

меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела к CD3, выбранного из табл. 1. Согласно другому аспекту имеющие второй домен воплощения по изобретению содержат участок CDR-H1, участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, при этом каждый из указанных участков происходит из моноклонального антитела, выбранного из группы антител, приведенных в табл. 1. В упомянутых выше воплощениях VH- и/или VL-домены могут быть скомпонованы в виде scFv, диатела, однодоменного антитела или однодоменного верблужьего антитела.

В других воплощениях вторые домены заявленных композиций происходят из антитела к CD3, выбранного из группы антител, приведенных в табл. 1. В одном из упомянутых выше воплощений второй домен заявленной композиции содержит парные последовательности VL- и VH-областей антитела к CD3, выбранного из группы антител, приведенных в табл. 1. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, в которой второй связывающий домен содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела huUCHT1 к CD3 из табл. 1. В упомянутых выше воплощениях VH- и/или VL-домены могут быть скомпонованы в виде scFv, части диатела, однодоменного антитела или однодоменного верблужьего антитела.

В других воплощениях scFv первого домена в такой композиции происходят из антитела к опухолевой клетке, выбранного из группы антител, приведенных в табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, в которой первый связывающий домен содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела к опухолевой клетке, выбранного из табл. 2. В одном из упомянутых выше воплощений первый домен приведенных композиций содержит парные последовательности VL- и VH-областей антитела к опухолевой клетке, описанного в данном изобретении. В упомянутых выше воплощениях VH- и/или VL-домены могут быть скомпонованы в виде scFv, части диатела, однодоменного антитела или однодоменного верблужьего антитела.

В другом воплощении первая часть композиций химерного полипептидного комплекса имеет последовательность, идентичную по меньшей мере примерно на 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей в табл. 13.

В другом воплощении композиции химерного полипептидного комплекса содержат первую часть, содержащую первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом указанные связывающие домены находятся в конфигурации диатела и каждый из указанных связывающих доменов содержит один VL-домен и один VH-домен. В одном из вариантов, воплощения по изобретению в конфигурации диатела содержат первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом VL- и VH-домены происходят из моноклональных антител со специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и антигеном эффекторной клетки, соответственно. В другом варианте, воплощения по изобретению в конфигурации диатела содержат первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом каждый из них содержит участок CDR-H1, участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, при этом каждый из указанных участков происходит из моноклонального антитела, способного связываться с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и антигеном эффекторной клетки, соответственно. Предусматривается, что воплощения по изобретению в конфигурации диатела содержат первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом VL- и VH-домены происходят из моноклональных антител, обладающих специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и антигеном эффекторной клетки, соответственно. Согласно другому аспекту воплощения по изобретению в конфигурации диатела содержат первый связывающий домен и второй связывающий домен, при этом каждый из них содержит участок CDR-H1, участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, причем каждый из указанных участков происходит из моноклонального антитела, способного связываться с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени и антигеном эффекторной клетки, соответственно. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, при этом второй связывающий домен диатела содержит парные VH- и VL-области, происходящие из моноклонального антитела, способного связываться с CD3 человека. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, где второй связывающий домен диатела содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела к CD3, выбранного из табл. 1. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, где второй связывающий домен диатела содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична после-

довательностям VL и VH антитела huUCHT1, выбранного из табл. 1. В других воплощениях второй домен диатела в такой композиции происходит из антитела к CD3, описанного в данном изобретении. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, где первый связывающий домен диатела содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична последовательностям VL и VH антитела к опухолевой клетке, выбранного из табл. 2. В других воплощениях первый домен диатела в такой композиции происходит из антитела к опухолевой клетке, описанного в данном изобретении.

В данной области техники известны терапевтические моноклональные антитела, из которых могут происходить VL- и VH-домены и CDR-домены, используемые в заявленных композициях. Такие терапевтические антитела включают, но не ограничиваются этим, ритуксимаб от IDEC/Genentech/Roche (см., например, патент США № 5736137), химерное антитело к CD20, используемое в лечении многих типов лимфом, лейкозов и некоторых аутоиммунных расстройств; офатумумаб, антитело к CD20, одобренное к применению в случае хронического лимфоцитарного лейкоза и находящееся в стадии разработки для фолликулярной неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ревматоидного артрита и рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза, разрабатываемое GlaxoSmithKline; лугатумумаб (HCD122), антитело к CD40, разработанное Novartis для неходжкинской лимфомы или лимфомы Ходжкина (см., например, патент США № 6899879); AME-133, антитело, разработанное Applied Molecular Evolution, которое связывается с клетками, экспрессирующими CD20, для лечения неходжкинской лимфомы; велтузумаб (hA20), антитело, разработанное Immunomedics, Inc., которое связывается с клетками, экспрессирующими CD20, для лечения иммунной тромбоцитопенической пурпур, HumaLYM, разработанное Intracel для лечения низкодифференцированной В-клеточной лимфомы, и окрелизумаб, разработанный Genentech, который представляет собой моноклональное антитело к CD20, для лечения ревматоидного артрита (см., например, заявку на патент США 20090155257), трастузумаб (см., например, патент США № 5677171), гуманизированное антитело к Her2/neu, одобренное к применению для лечения рака молочной железы, разработанное Genentech; пертузумаб, антитело, являющееся ингибитором димеризации HER2, разработанное Genentech для лечения рака предстательной железы, рака молочной железы и рака яичника (см., например, патент США № 4753894); цетуксимаб, антитело к EGFR, используемое для лечения экспрессирующего рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) метастатического колоректального рака KRAS дикого типа и рака головы и шеи, разработанное Imclone и BMS (см. патент США № 4943533; PCT WO 96/40210); панитумумаб, полностью человеческое моноклональное антитело, обладающее специфичностью к рецептору эпидермального фактора роста (также известному как рецептор EGF, EGFR, ErbB-1 и HER1), в настоящее время поставляемое на рынок от Amgen для лечения метастатического колоректального рака (см. патент США № 6235883); залутумумаб, полностью человеческое IgG1-типа моноклональное антитело, разработанное Genmab, которое направлено на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), для лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи (см., например, патент США № 7247301); нимотузумаб, химерное антитело к EGFR, разработанное Biocom, YM Biosciences (Куба) и Oncosciences (Европа) для лечения плоскоклеточных карцином головы и шеи, назофарингеального рака и глиомы (см., например, патент США № 5891996, патент США № 6506883); алемтузумаб, гуманизированное моноклональное антитело к CD52, поставляемое на рынок Bayer Schering Pharma, для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), кожной Т-клеточной лимфомы (CTCL) и Т-клеточной лимфомы; муромонаб-CD3, антитело к CD3, разработанное Ortho Biotech/Johnson & Johnson, используемое в качестве иммуносупрессорного биологического препарата, назначаемого для снижения вероятности острого отторжения у пациентов с органами трансплантатами; ибритумумаб тиуксетан, моноклональное антитело к CD20, разработанное IDEC/Schering AG в качестве лекарственного средства для некоторых форм В-клеточной неходжкинской лимфомы; гемтузумаб озогамидин, антитело к CD33 (белку р67), присоединенное к цитотоксическому хелатору тиуксетану, к которому присоединен радиоактивный изотоп, разработанное Celltech/Wyeth и используемое для лечения острого миелогенного лейкоза; ABX-CBL, антитело к CD147, разработанное Abgenix; ABX-IL8, антитело к IL8, разработанное Abgenix; ABX-MA1, антитело к MUC18, разработанное Abgenix; пемтумумаб (R1549, 90Y-muHMFG1), антитело к MUC1, разрабатываемое Antisoma; терекс (R1550), антитело к MUC1, разработанное Antisoma; ангиомаб (AS1405), разработанный Antisoma; HuBC-1, разработанное Antisoma; тиоплатин (AS1407), разработанный Antisoma; антегрин (натализумаб), антитело к альфа-4-бета-1 (VLA4 (очень поздний антиген-4)) и альфа-4-бета-7, разработанное Biogen; mAb (моноклональное антитело) к VLA-1, антитело к интегрину VLA-1, разработанное Biogen; mAb к LTBR, антитело к рецептору лимфотоксина-бета (LTBR), разработанное Biogen; CAT-152, антитело к TGF-β2 (трансформирующий ростовой фактор P2), разработанное Cambridge Antibody Technology; J695, антитело к IL-12, разработанное Cambridge Antibody Technology и Abbott; CAT-192, антитело к TGFβ1, разработанное Cambridge Antibody Technology и Genzyme; CAT-213, антитело к зотаксину-1, разработанное Cambridge Antibody Technology; лимфостат-В, антитело к Blys (стимулятор В-лимфоцитов), разработанное Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences Inc.; mAb к TRAIL-R1 (рецептор 1 родственного фактору

некроза опухоли лиганда, индуцирующего апоптоз), антитело к TRAIL-R1, разработанное Cambridge Antibody Technology и Human Genome Sciences, Inc.; герцептин, антитело к HER-рецепторному семейству, разработанное Genentech; анти-тканевой фактор (ATF), антитело к тканевому фактору, разработанное Genentech; ксолар (омализумаб), антитело к IgE, разработанное Genentech; антитело MLN-02 (ранее LDP-02), разработанное Genentech и Millennium Pharmaceuticals; HUMAX-CD4®, антитело к CD4, разработанное Genmab; тоцилизумаб и антитело к IL6R (рецептор интерлейкина 6), разработанное Chugai; HUMAX-IL15, антитело к IL15, разработанное Genmab и Amgen; HUMAX-Inflam, разработанное Genmab и Medarex; HUMAX-Cancer, антитело к гепараназе I, разработанное Genmab и Medarex и Oxford Glyco-Sciences; HUMAX-Lymphoma, разработанное Genmab и Amgen; HUMAX-TAC, разработанное Genmab; IDEC-131, антитело к CD40L (лиганд CD40), разработанное IDEC Pharmaceuticals; IDEC-151 (кленоликсимаб), антитело к CD4, разработанное IDEC Pharmaceuticals; IDEC-114, антитело к CD80, разработанное IDEC Pharmaceuticals; IDEC-152, антитело к CD23, разработанное IDEC Pharmaceuticals; антитело к KDR (рецептор, содержащий домен вставки киназы), разработанное Imclone; DC101, антитело к flk-1 (киназа-1 эмбриональной печени), разработанное Imclone; антитела к VE-кадгерину, разработанные Imclone; CEA-CIDE (лабетузимаб), антитело к канцерозембриональному антигену (CEA), разработанное Immunomedics; ервой (ипилимумаб), антитело к CTLA4, разработанное Bristol-Myers Squibb для лечения меланомы; Lymphocide® (эпратузимаб), антитело к CD22, разработанное Immunomedics; AFP-Cide, разработанный Immunomedics; миеломацид, разработанный Immunomedics; LkoCide, разработанный Immunomedics; простацид, разработанный Immunomedics; MDX-010, антитело к CTLA4, разработанное Medarex; MDX-060, антитело к CD30, разработанное Medarex; MDX-070, разработанное Medarex; MDX-018, разработанное Medarex; осидем (osidem) (IDM-1), антитело к HER2, разработанное Medarex и Immuno-Designed Molecules; HUMAX®-CD4, антитело к CD4, разработанное Medarex и Genmab; HuMax-IL15, антитело к IL15, разработанное Medarex и Genmab; антитела к молекулам-1 межклеточной адгезии (ICAM-1) (CD54), разработанные MorphoSys, MOR201; тремелимумаб, антитело к CTLA-4, разработанное Pfizer; висилизимаб, антитело к CD3, разработанное Protein Design Labs; антитело к $\alpha 5\beta 1$ -интегрину, разработанное Protein Design Labs; антитело к IL-12, разработанное Protein Design Labs; ING-1, антитело к EPCAM, разработанное Хома; и MLN01, антитело к бета2-интегрину, разработанное Хома; при этом все ссылки на антитела, приведенные выше в этом абзаце, явным образом включены в данное описание посредством ссылки. Последовательности для приведенных выше антител могут быть получены из общедоступных баз данных, патентов или литературных ссылок. Помимо этого, неограничивающие примеры моноклональных антител и последовательности VH и VL из антител к CD3 представлены в табл. 1, а неограничивающие примеры моноклональных антител и последовательностей VH и VL к маркерам раковых, опухолевых клеток или клеток-мишеней представлены в табл. 2.

Таблица 1

Моноклональные антитела к CD3 и их последовательности

Название клона	Название антитела	Мишень	Последовательность VH	Последовательность VL
huOKT3		CD3	QVQLVQSGGGVVPGRSLR LSCKAS <u>GYTFTRYTMH</u> WVR QAPGKGLEWIGYINPSRGY <u>TNYNQVKDRFTISRDN</u> SK NTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYYDDHYCLDYWGQGT PVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRTV ITC <u>SASSSVSYMN</u> WYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSR FSGSGSGTDYFTTISLQPE DIATYYC <u>QOWSSNPFT</u> FGQG TKLQITR
huUCHT1		CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAAS <u>GYSTGYTMN</u> WVR QAPGKGLEWVALINPYKGV <u>STYNQKFKDRFTISVD</u> KSK NTAYLQMNSLRAEDTAVY CARSGYYGDSWDYFDVWGQ GTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRTV ITC <u>RASQDIRNYLN</u> WYQQKP GKAPKLLIY <u>YTSRLES</u> GVPS RFSGSGSGTDYTLTISLQPE EDFATYYC <u>QQGNLTPWT</u> FGQ GTKVEIK
hu12F6		CD3	QVQLVQSGGGVVPGRSLR LSCKAS <u>GYTFTSYTMH</u> WVR QAPGKGLEWIGYINPSSGY <u>TKYNQKFKDRFTISAD</u> KSK STAFLQMDSLRPEDTGVYF CARWQDYDYFDYWGQGT PVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRTV MTCRASSSVSYMHYQQTPG KAPKPWIY <u>ATSNLAS</u> GVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQPE DIATYYC <u>QOWSSNPPT</u> FGQG TKLQITR
mOKT3		CD3	QVQLQSGAELARPGASVK MSCKAS <u>GYTFTRYTMH</u> WVK QRPQGGLWIGYINPSRGY <u>TNYNQKFKDKATLT</u> TDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYYDDHYCLDYWGQGT TLTVSS	QIVLTQSPAIMASAPGEKVT MTCRASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLASGVPAH FRGSGSGTSYSLTISGMEAE DAATYYC <u>QOWSSNPFT</u> FGSG TKLEINR
MT103	блинатумоаб	CD3	DIKLQSGAELARPGASVK MSCKTS <u>GYTFTRYTMH</u> WVK QRPQGGLWIGYINPSRGY <u>TNYNQKFKDKATLT</u> TDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYYDDHYCLDYWGQGT TLTVSS	DIQLTQSPAIMASAPGEKVT MTCRASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKVASGVPIR FSGSGSGTSYSLTISMEAE DAATYYC <u>QOWSSNPPLT</u> FGAG TKLELK
MT110	солитомаб (solitomab)	CD3	DVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKAS <u>GYTFTRYTMH</u> WVR QAPGQGLEWIGYINPSRGY <u>TNYADSVKGRFTIT</u> TDKST STAYMELSSLRSEDATYY CARYYDDHYCLDYWGQGT TLTVSS	DIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSYMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPAR FSGSGSGTDYSLTINSLEAE DAATYYC <u>QOWSSNPPLT</u> FGGG TKVEIK
CD3.7		CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAY WGQGTTLTVSS	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGYYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVF GGGTKLTVL
CD3.8		CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVGIRSKYNN YATYYADSVKGRFTISRDD SKNTLYLQMNLSRAEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTTLTVSS	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTL TCGSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGV PARFSGSLLGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL
CD3.9		CD3	EVQLLESGGGLVQPGGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTTLTVSS	ELVVTQEPSTLVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNLWVF GGGTKLTVL
CD3.10		CD3	EVKLLESGGGLVQPKGSLK LSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDD SQSILYLQMNLLKTEDTAM YYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTTLTVSS	QAVVTQESALTSPGETVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQE KPDHFLTGLIGGTNKRAPGV PARFSGSLIGDKAALTITGA QTEDEAIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL

* Подчеркнутые последовательности, если они присутствуют, представляют собой CDR в пределах VL и VH.

Таблица 2

Моноклональные антитела к клетке-мишени и их последовательности

Tysabri™	натализумаб	Альфа-4-интегрин	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGFENIK DTYI HWVRQAPGQRL EW MGRI DPANGYTKYDPKFOGRV TITADTSASTAYMELSS LRSEDТАVYYCARE EGYY GNYGVA MDYWGQGTЛV TVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITC KTSQDINKY MAWYQQT PGKAPRLLI HYTSALQ PGIPSRFSG SGSGRDYFTFTISSLQP EDIATYYC LQYDNLWT FGQGTKVEIK
REGN910	несвакумаб	Ang2	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAAS GFTFSSYDI HWVRQATGKGL EWVSAI GPAGDTYYPGSV KGRFT ISRENAKNSLYLQMNSL RAGDTAVYYCARG GLITF GGLIAPFD YWQGTЛVT VSS	EIVLTQSPGTLSTSPG ERATLSCRA SQSVSST YLAWYQ KPGQAPRLI IY GASSRAT GIPDRFS SGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYC QHYNDSQ TFGQGTKVEIK
hMFE23		CEA	QVKLEQSGAEVKKPGAS VKLSCKAS GFNIKDSYM HWLRQGPGRLEWIGWI DPENGDT EYAPKFQGKA TFTTDTANTAYLGLSS LRPEDТАVYYCNEG TPT GPYYFD YWQGTЛVTVS S	ENVLTQSPSSMSASVG DRVNIACSA SSSVSYM HWFQKPGKSPKLWIY STSN LAS GVPSRFSGS SGTDYSLTISSMQPE DAATYYC QRSSYPLT FGGGTKLEIK
M5A (гуманизиров. T84.66)		CEA	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFENIK DTYM HWVRQAPGKGL EWVARI DPANGNSKYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNS LRAEDТАVYYCAP FGYY VSDYAMAY WGQGTЛVT SS	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITC RAGESVDIF GVGFLHWYQ KPGKAP KLLIY RASNLES GVPS RFSGSGSRDFTLTIS SLQPEDFATYYC QQTN EDPYT FGQGTKVEIK
M5B (гуманизиров. T84.66)		CEA	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFENIK DTYM HWVRQAPGKGL EWVARI DPANGNSKYVPKFOGRA TISADTSKNTAYLQMNS LRAEDТАVYYCAP FGYY VSDYAMAY WGQGTЛVT SS	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITC RAGESVDIF GVGFLHWYQ KPGKAP KLLIY RASNLES GVPS RFSGSGSRDFTLTIS SLQPEDFATYYC QQTN EDPYT FGQGTKVEIK
CEA-Cide	лабетузумаб (MN-14)	CEACAM5	EVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCSASGFDF TYWM SWVRQAPGKGL EWIG EI HPDSSTINYAPSLKDRF TISRDNAKNTLFLQMDS LRPEDTG VYFCAS LYFC FPWFAY WGQGTЛVTSS	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITC KASQDVGTS VAWYQ KPGKAPKLLI YWTSTRHT GVPSRFSG SGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYC QQYSLYRS FGQGTKVEIK

CEA-Scan	арцитумомаб	CEACAM5	EVKLVESGGGLVQP ~~GG~~ LRLSCATS <u>GFTFTDYIM</u> <u>NWVRQPPGKALEWLGFI</u> <u>GNKANGYTTEYSAS</u> VKG RFTISRDKSQSILYLQM NTLRAEDSA <u>TYICTRDR</u> GLRFYFDYWGQGTTLTV SS	QTVLSQSPAILSASPG EKVTMTC <u>RASSSVTYI</u> <u>HWYQKPGSSPKSWIY</u> <u>ATSNLASG</u> VPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAE DAATYYC <u>QHWSSKPPT</u> FGGGTKLEIKR
MT110		CEACAM5	EVQLVESGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTVS <u>SYWM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVGFI</u> <u>RNKANGGTTEYAASVKG</u> RFTISRDDSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARD <u>R</u> <u>GLRFYFDYWGQGT</u> TVTV SS	QAVLTQPASLSASPGA SASLTC <u>TLRRGINVGA</u> <u>YSIY</u> WYQKPGSPPOY LLRYKSDSDK <u>QOQGS</u> GV SSRFSASKDASANAGI LLISGLQSEDEADYYC <u>MIWHS</u> GASAVFGGGTK LTVL
MT103	блинатумомаб	CD19	QVQLQQSGAELVRPGSS VKISCKASGYAFS <u>SYWM</u> <u>NWVKQRPQGLEWIGQI</u> <u>WPGDGD</u> TNYNGKFKGKA TLTADESSSTAYMQLSS LASEDSAVYFCAR <u>RETT</u> <u>TVGRYYYAMDY</u> WGQGT VTVSS	DIQLTQSPASLAVSLG QRATISCKASQSV <u>VDYD</u> <u>GDSY</u> LNWYQQIPGQPF KLLIYDASNLVS <u>GIPP</u> RFSGSGSGTDFTLNH PVEKVDAAATYHC <u>QOQT</u> <u>EDPWT</u> FGGGTKLEIK
Арзерра	офатумумаб	CD20	EVQLVESGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTFN <u>DYAM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVSTI</u> <u>SWNSGSGIGYADSVKGRF</u> TISRDNAKKSLYLQMNS LRAEDTALYYCAK <u>DIQY</u> <u>GNYYYGMDV</u> WGQGTTVT VSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC <u>RASQSVSSY</u> <u>LAWYQKPGQAPRLLI</u> <u>YDASN</u> RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYC <u>QQRSNWPI</u> <u>TFGQ</u> GTRLEIK
Веххар™	тозитумомаб	CD20	QAYLQQSGAELVRPGAS VKMSCKASGYTFT <u>SYNM</u> <u>HWVKQTPRQGLEWIGAI</u> <u>YPGNGD</u> TSYNQKFKGKA TLTVDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCAR <u>VVYY</u> <u>SNSYWYFDV</u> WGTGTTVT VSG	QIVLSQSPAILSASPG EKVTMTC <u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQKPGSSPKPWIY</u> <u>APSNLAS</u> GVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAE DAATYYC <u>QQWSFNPPT</u> FGAGTKLELK
Газива	обинутузумаб	CD2	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKASGYAFS <u>YSWI</u> <u>NWVRQAPGQGLEWMGRI</u> <u>FPGDGD</u> TDYNGKFKGRV TITADKSTSTAYMELSS LRSEDATAVYYCAR <u>NVFD</u> <u>GYWL</u> VYWGQGTTLTVSS	DIVMTQTPLSLPVTGP EPASISCRSSKSL <u>LHS</u> <u>NGITYLY</u> WYLQKPGQS PQLLIYQMSNLVS <u>GVP</u> DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCA <u>QN</u> <u>LELPYT</u> FGGGTKVEIK

	окрелизумаб/ 2H7 v16	CD20	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAAS <u>GYTF</u> <u>TSYNM</u> HWVRQAPGKGLEWVGA <u>I</u> <u>YPGN</u> <u>GD</u> <u>TSYNQKFKGRF</u> TISVDKSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR <u>VVYY</u> <u>SNSYWF</u> <u>FDV</u> WGQGLVT VSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITC <u>RASSSV</u> <u>SYM</u> HWYQQKPGKAPKPLIY <u>APSNLAS</u> GVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPE DFATYYC <u>QQWSFN</u> <u>PPT</u> FGQGTKVEIK
Rituxan™	ритуксимаб	CD20	QVQLQQPGAELVKPGAS VKMSCKAS <u>GYTF</u> <u>TSYNM</u> HWVKQTPGRGLEWIGA <u>I</u> <u>YPGN</u> <u>GD</u> <u>TSYNQKFKGKA</u> TLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCAR <u>STYY</u> <u>GGDWYF</u> <u>FN</u> WGAGTTVT SA	QIVLSQSPAILSASPG EKVTMTCRAS <u>SSVS</u> <u>YI</u> HWFQQKPGSSPKPWIY <u>ATSNLAS</u> GVPRFSGS GSGTSYSLTISRVEAE DAATYYC <u>QQWTSN</u> <u>PPT</u> FGGGTKLEIK
Zevalin™	ибритумомаб тиуксетан	CD20	QAYLQQSGAELVRPGAS VKMSCKAS <u>GYTF</u> <u>TSYNM</u> HWVKQTPRGLEWIGA <u>I</u> <u>YPGN</u> <u>GD</u> <u>TSYNQKFKGKA</u> TLTVDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCAR <u>VVYY</u> <u>SNSYWF</u> <u>FDV</u> WGTGTTVT VSA	QIVLSQSPAILSASPG EKVTMTCRAS <u>SSVS</u> <u>SYM</u> HWYQQKPGSSPKPWIY <u>APSNLAS</u> GVPRFSGS GSGTSYSLTISRVEAE DAATYYC <u>QQWSFN</u> <u>PPT</u> FGAGTKLEIK
Милотарг	гемтузумаб (hP67.6)	CD33	QLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKAS <u>GYTITD</u> <u>SNH</u> <u>W</u> VRQAPGQSLWIGYI <u>Y</u> <u>YNGGTDYNQKFKN</u> RATL TVDNPTNTAYMELSSLR SEDTDFYYCVNG <u>NFWLA</u> <u>YWGQGL</u> TLTVSS	DIQLTQSPSTLSASVG DRVITITC <u>RASESLDNY</u> <u>GIRFLT</u> WFQQKPGKAP KLLMY <u>AASNQGS</u> GVPS RFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDFATYYC <u>QQTK</u> <u>EVPWS</u> FGQGTKVEIK
Даратумумаб		CD38	EVQLLESGGGLVQPGGG LRLSCAVS <u>GFTFNSFAM</u> SWVRQAPGKGLEWVSA <u>I</u> <u>SGSGGGT</u> YYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYFCAR <u>ADKIL</u> <u>WFGE</u> <u>PVFDY</u> WGQGLVT VSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAWYQQKPGQAPRLLI <u>YDASN</u> RATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEP EDFAVYYC <u>QQRSNWPP</u> <u>TFGQGT</u> KVEIK
	1F6	CD70	QIQLVQSGPEVKKPGET VKISCKAS <u>GYTF</u> <u>TNYGM</u> <u>NWVKQAPGKGLKWMGWI</u> <u>NTYTGEPT</u> YADAFKGRF AFSLETASTAYLQINN LKNEDTATYFCARD <u>YGD</u> <u>YGM</u> <u>DY</u> WGQGSTVTSS	DIVLTQSPASLAVSLG QRATISCRAS <u>KSVSTS</u> <u>GYSEFMH</u> WYQQKPGQPP KLLIY <u>LASNLES</u> GVPA RFSGSGSGTDFTLNII PVEEDAATYYC <u>QHRSR</u> <u>EVPWT</u> FGGGTKLEIK

	2F2	CD70	QVQLQQSGTELMTPGAS VTMSCKTS <u>GYTFSTYWI</u> <u>EWVKQRP</u> GHGLEWIG <u>EI</u> <u>LGPSGYTDYNEKFKAKA</u> TFTADTSSNTAYMQLSS LASEDSAVYYCAR <u>WDRL</u> <u>YAMDY</u> WGGGTSVTSS	DIVLTQSPASLTVSLG QKTTISCR <u>RASKSVSTS</u> <u>GYSFMH</u> WYQLKPGQSP KLLIY <u>LASDLPS</u> GVPA RFGSGSGTDFTLKI PVEEEDAATYYC <u>QHSR</u> <u>EIPY</u> TFGGGTKLEIT
	2H5	CD70	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS <u>SYIM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVI</u> <u>SYDGRNKYYADSVKGRF</u> TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR <u>DTDG</u> <u>YDFDY</u> WGQGLTVTVSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCR <u>RASQSVSSY</u> <u>LAWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>YDASNRA</u> TGIPARFSG SGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYC <u>QORTNWPL</u> <u>TFGGG</u> TKVEIK
	10B4	CD70	QIQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFG <u>YYAM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVI</u> <u>SYDGSIKYYADSVKGRF</u> TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR <u>EGPY</u> <u>SNYLDY</u> WGQGLTVTVSS	AIQLTQSPSSLSASVG DRVITTCR <u>RASQGISSA</u> <u>LAWYQQKPGKAPKFLI</u> <u>YDASSLES</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQF EDFATYYC <u>QQFN</u> SYPF <u>TFGPG</u> TKVDIK
	8B5	CD70	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCATSGFTFS <u>DYGM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVI</u> <u>WYDGSNKYYADSVKGRF</u> TISRDN SKKTLQLQMNS LRAEDTAVYYCAR <u>DSIM</u> <u>VRGDY</u> WGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCR <u>RASQGISSW</u> <u>LAWYQQKPEKAPKSLI</u> <u>YAASSLOS</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQF EDFATYYC <u>QQYNSYPL</u> <u>TFGGG</u> TKVEIK
	18E7	CD70	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS <u>DHGM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVI</u> <u>WYDGSNKYYADSVKGRF</u> TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR <u>DSIM</u> <u>VRGDY</u> WGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCR <u>RASQGISSW</u> <u>LAWYQQKPEKAPKSLI</u> <u>YAASSLOS</u> GVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQF EDFATYYC <u>QQYNSYPL</u> <u>TFGGG</u> TKVEIK
	69A7	CD70	QVQLQESGPGLVKPSSET LSLTCTVSGGSVS <u>SDYY</u> <u>YWSWIRQPPGKGLEWL</u> <u>YIYYSGSTNYNPSLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLKLR SVTTADTAVYYCARGDG <u>DYGGNCF</u> DYWGQGLTVT VSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCR <u>RASQSVSSY</u> <u>LAWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>FDASNRA</u> TGIPARFSG SGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYC <u>QORSNWPL</u> <u>TFGGG</u> TKVEIK

CE-355621		cMET	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT <u>SYGF</u> SWVRQAPGQGLEWMGWI <u>SASNGNTYYAQKLG</u> RV TMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCAR <u>VYAD</u> <u>YADY</u> WGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTC <u>RASQGIN</u> TW <u>LAWY</u> QKPGKAPKLLI <u>YAASSLKS</u> GVPSRFG SGSGTDFTLTISLQ EDFATYYC <u>QOANSFPL</u> <u>TF</u> GGGKVEIK
LY2875358	эмибетузмаб	cMET	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFT <u>DYYM</u> HWVRQAPGQGLEWMGRV <u>NPNRRTT</u> YNQKFEGRV TMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYC <u>ARANWL</u> <u>DY</u> WGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCVS <u>SSVSSI</u> <u>YLHWY</u> QKPGKAPKLL IY <u>STSN</u> LASGVPSRFS SGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QVYSGYP</u> <u>LT</u> FGGKVEIK
MetMab	онартузмаб	cMET	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGYTFT <u>SYWL</u> HWVRQAPGKGLEWVGMI <u>DPSNSDTRFNP</u> FKDRF TISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYC <u>ATYRSY</u> <u>VTPLDY</u> WGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC <u>KSSQSLLYT</u> <u>SSQKNYLAWY</u> QKPGK APKLLIY <u>WASTRES</u> GV PSRFGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYC <u>QO</u> <u>YYAYPWT</u> FGQGTKVEI K
	тримелимуаб (CP-675206 или 11.2.1)	CTLA4	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAAS <u>GFTFSSYGM</u> HWVRQAPGKGLEWVAVI <u>WYDGSNKYYADSVKGRF</u> TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC <u>ARDPRG</u> <u>ATLYYYYYGMDV</u> WGQGLTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC <u>RASQSINSY</u> <u>LDWY</u> QKPGKAPKLLI <u>YAASSLOS</u> GVPSRFG SGSGTDFTLTISLQ EDFATYYC <u>QOYYSTPF</u> <u>TF</u> GPQGTKVEIK
Ервой	ипилимуаб 10D1	CTLA4	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS <u>SYTM</u> HWVRQAPGKGLEWVTFI <u>SYDGNKYYADSVKGRF</u> TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC <u>ARTGWL</u> <u>GPFDY</u> WGQGLTVTVSS	EIVLTQSPGTLTSLSPG ERATLSC <u>RASQSVGSS</u> <u>YLAWY</u> QKPGQAPRLL IY <u>GAFSRAT</u> GIPDRFS SGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYC <u>QYGS</u> SP <u>WT</u> FGQGTKVEIK
AGS16F	H16-7.8	ENPP3	QVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCTVSGGSIS <u>SGGY</u> YWSWIRQHPGKLEWIG <u>IYYSGSTYYNP</u> SLKSR VTISVDTSKNQFSLKLN SVTAADTAVFYCAR <u>VAI</u> <u>VTTIPGGM</u> MDVWGQGLTVTVSS	EIVLTQSPDFQSVTPK EKVTITC <u>RASQSIGIS</u> <u>LHWY</u> QKPKDQSPKLLI <u>KYASQSF</u> SGVPSRFG SGSGTDFTLTINSLEA EDAATYYC <u>HQSR</u> SFPW <u>TF</u> GQGTKVEIK

MT110	солиномаб	EpCAM	EVQLLEQSGAELVRPGT SVKISCKASGYAFT NYW LG WVKQRPQGHLEWIG D IFPGSGNIHYNEKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLS SLTFEDSAVYFCAR LRN WDEPMDY WGQGTTVTVS S	ELVMTQSPSSLTIVTAG EKVTMSC KSSQSL LNS GNQKNYLT WYQKPGQ PPKLLIY WASTRES GV PDRFTSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYC Q N DYSYPLT FGAGTKLEI K
MT201	адекватумаб	EpCAM	EVQLLESGGGVVPGRS LRLSCAASGFTFS SYGM HWVRQAPGKGLEWVAVI SYDGSNKYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCA DMGW GSGWRPYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS	ELQMTQSPSSLSASVG DRVTITC RTSQSI SSY LNWYQQKPGQFPKLLI YWASTRES GVDPDRFSG SGSGTDFTLTISLQ EDSATYYC QGSYDIPY TFGQGTKLEIK
Панорекс	эдреколомаб Mab CO17-1A	EpCAM	QVQLQQSGAELVRPGTS VKVSCKAS GYAFTNYLI EWVKQRPQGHLEWIG I NPGSGGT NYNEKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSS LTSDDSAVYFCAR DGPW FAY WGQGLTVTSA	NIVMTQSPKSMMSVG ERVTLTCKAS ENVVTY VSWYQQKPEQSPKLLI Y GAS NRYTGVPDRFTG SGSATDFTLTISVQA EDLADYHC QGYSYPY TFGGGTKLEIK
	тукотуэумаб	EpCAM	QIQLVQSGPELKKPGET VKISCKAS GYTFTNYGM NWVRQAPGKGLKWMGWI NTYTGEPTYAD DFKGRF VFSLETSASTAFLQLNN LRSEDATYFCVRF ISK GDY WGQGSVTVSS	QILLTQSPAIMSASPG EKVTMTCS SASSSVSYM LWYQQKPGSSPKPWIF DTSNLAS GFPAFSGS SGGTSYSLIISSMEAE DAATYYC HQRSGYPYT FGGGTKLEIK
UBS-54		EpCAM	VQLQQSDAELVKPGASV KISCKAS GYTFTDHAIH WVKQNPQGLEWIG YFS PGNDDFKYNERFKGKAT LTADKSSSTAYVQLNSL TSEDSAVYFCTR SLNMA Y WGQGSVTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINCK KSSQSVLYS SNNKNYLA WYQKPGQ PPKLLIY WASTRES GV PDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYC Q Q YYSYPLT FGGGTKVKE S
3622W94	323/A3	EpCAM	EVQLVQSGPEVKKPGAS VKVSCKAS GYTFTNYGM NWVRQAPGQGLEWMGWI NTYTGEPTYGE DFKGRF AFSLDTSASTAYMELSS LRSEDATVYFCAR F GN VDY WGQGSVTVSS	DIVMTQSPSLPVTTPG EPASISCR SSINKKGS NGITYLYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLASGVP DRF SGSGS GTDFTLKI SRVEAEDVGVIYCA Q N LEIPRT FGQGTKVEIK

4D5MOCBv2		EpCAM	EVQLVQSGPGLVQPGGG VRISCAASGYTFT NYGM NWVKQAPGKGLEWMGWI NTYTGESTYADSFKGRF TFSLDTSASAAYLQINS LRAEDTAVYYCAR FAIK GDYWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITC RSTKSLLS NGITYLYWYQKPGKA PKLLIY QMSNLAS GVP SRFSSSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC AQN LEIPRT FGGQTKVEIK
4D5MOCB		EpCAM	EVQLVQSGPGLVQPGGG VRISCAASGYTFT NYGM NWVKQAPGKGLEWMGWI NTYTGESTYADSFKGRF TFSLDTSASAAYLQINS LRAEDTAVYYCAR FAIK GDYWGQGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITC RSTKSLLS NGITYLYWYQKPGKA PKLLIY QMSNLAS GVP SRFSSSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC AQN LEIPRT FGGQTKVELK
MEDI-547	1C1	EphA2	EVQLLESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTF HYMM AWVRQAPGKGLEWVSRI GPSGGPPTHYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAGYDSG YDYVAVAGPAEYFQH WG QGTLLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITC RASQSI STW LAWYQKPGKAPKLLI YKASNLHT GVPSRFSG SGSGTEFSLTISGLQP DDFATYYC QQYNSYSR T FGGQTKVEIK
MORAb-003	фарлету зумаб	FOLR1	EVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCSAS GFTFSGYGL SWVRQAPGKGLEWVAMI SSGGSYTYADSVKGRF AISRDNKNTLFLQMDS LRPEDTGVYFC ARHGDD PAWF AYWGQGTPTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVG DRVITITCSVS SSI SSN NLHWYQKPGKAPKFW IYGT SNLASGVPSRFS SGSGTDYTFITISLQ PEDIATYYC QQWSSYP YMYT FGGQTKVEIK
M9346A	huMOV19 (vLCv1 00)	FOLR1	QVQLVQSGAEVVKPGAS VKISCKASGYTFT GYFM NWVKQSPGQSLEWIGRI HPYDGDTFYNQKFQ GKA TLTVDKSSNTAHMELLS LTSEDFAVYYCT YDGS RAMDY WGQGTTVTVSS	DIVLTQSPSLSLAVSLG QPAISCK KASQSVSFA GTSLMH WYHQKPGQQP RLLIY RASNLEA GVDP RFSGSGSKTDFTLNIS PVEAEDAATYYC QQSR EYPYT FGGGTKLEIK
M9346A	huMOV19 (vLCv1 60)	FOLR1	QVQLVQSGAEVVKPGAS VKISCKASGYTFT GYFM NWVKQSPGQSLEWIGRI HPYDGDTFYNQKFQ GKA TLTVDKSSNTAHMELLS LTSEDFAVYYCT YDGS RAMDY WGQGTTVTVSS	DIVLTQSPSLSLAVSLG QPAISCK KASQSVSFA GTSLMH WYHQKPGQQP RLLIY RASNLEA GVDP RFSGSGSKTDFTLTIS PVEAEDAATYYC QQSR EYPYT FGGGTKLEIK

26B3 F2		FOLR1	GPQLVKPGASVKISCKA SDYSFTGYFMNWVMQSH GKSLEWIGRIFFPYNGDT FYNQKFKGRATLTVDKS SSTAHEMLRSLASEDSA VYFCARGTHYFDYWGQG TTLTVSS	PASLSASVGETVTITC RTSENIFFSYLAWYQQK QGISPQLLVYNAKTLA EGVPSRFSGSGSGTQF SLKINSLQPEDFGSYY COHHYAFPWTFGGGSK LEIK
RG7686	GC33	GPC3	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTDYEM HWVRQAPGQGLEWMGAL DPKTGDTAYSQKFKGRV TLTADKSTSTAYMELSS LTSEDTAVYYCTRFYSY TYWGQGTILVTVSS	DVVMTQSPLSLPVTGP EPASISCRSSQSLVHS NGNTYLHWYLOKPGQS PQLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGYYCSQN THVPPTFGQGTKLEIK
	4A6	GPC3	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTSYWI AWVRQMPGKGLEWMGII FPGDSDTRYSPSFQGV TISADRSIRTAYLQWSS LKASDTALYYCARTRREG YFDYWGQGTILVTVSS	EIVLTQSPGTLSLSPG ERATLSCRAVQSVSSS YLAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGGSSP TFGGGTKVEIK
	11E7	GPC3	EVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKGSGYSFTNYWI AWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGV TISADKSIRTAYLQWSS LKASDTAMYYCARTRREG YFDYWGQGTILVTVSS	EIVLTQSPGTLSLSPG ERATLSCRASQSVSSS YLAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGGSSP TFGGGTKVEIK
	16D10	GPC3	EVQLVQSGADVTKPGES LKISCKVSGYRFTNYWI GWMRQMSGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGHV TISADKSINTAYLRWSS LKASDTAIYYCARTRREG FFDYWGQGTPTVTSS	EILLTQSPGTLSLSPG ERATLSCRASQSVSSS YLAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYGGSSP TFGQGTKVEIK
AMG-595		HER1(EGFR)	QVQLVESGGGVVQSGRS LRLSCAASGFTFRNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSCKYYADSVGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDGYD ILTGNNPRDFDYWGQGT LVTSS	DTVMTQTPLSSHVTLG QPASISCRSSQSLVHS DGNTYLSWLQQRPGQP PRLLIYRISRRFSGVP DRFSGSGAGTDFTLEI SRVEAEDVGYYCMQS THVPRTFGQGTKVEIK

Erbitux™	цетуксимаб	HER1(EGFR)	QVQLKQSGPGLVQPSQS LSITCTVSG <u>GFSLTNYGV</u> HWVRQSPGKGLEWLGVI <u>WGGNT</u> DYNTPFSTRLS INKDNSKSQVFFKMNSL QSNDAIYYC <u>ARALTY</u> <u>DYEFAY</u> WGQGLTVTVA	DILLTQSPVILSVSPG ERVSFSCRAS <u>QSIGTN</u> IHWYQORTNGSPRLLI <u>KYAS</u> ESISGIPSRFSG SGSGTDFTLSINSVES EDIADYYC <u>QONNNWPT</u> <u>TF</u> GAGTKLELK
GA201	имгатузумаб	HER1(EGFR)	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCASGFTFT <u>DYKI</u> <u>HWVRQAPGQGLEWMGYF</u> <u>NPNSGYSTYAQKFQGRV</u> TITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAR <u>LSPG</u> <u>GYVMDA</u> WGQGTITVTS S	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC <u>RASQGINNY</u> <u>LNWYQQKPGKAPKRLI</u> <u>YNTNNLOT</u> GVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQP EDFATYYC <u>LQHNSFPT</u> FGQGTKLEIK
Humax	залутумумаб	HER1(EGFR)	QVQLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGFTFS <u>TYGM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVI</u> <u>WDDGSYKYYGDSVKGRF</u> TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR <u>DGIT</u> <u>MVRGVMKDYFDY</u> WGQGT LVTVSS	AIQLTQSPSSLSASVG DRVITTC <u>RASQDISSA</u> <u>LWYQQKPGKAPKRLI</u> <u>YDASSLES</u> GVPSRFSG SESGTDFTLTISLQP EDFATYYC <u>QOFNSYPL</u> <u>TF</u> GGGTKVEIK
IMC-11F8	нецитумумаб	HER1(EGFR)	QVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCTVSGGSIS <u>SGDY</u> <u>YWSWIRQPPGKLEWIG</u> <u>YIYSGSTDYNPSLKS</u> VTMSVDTSKNQFSLKVN SVTAADTAVYYCAR <u>VSI</u> <u>FGVGTFDY</u> WGQGLTVT SS	EIVMTQSPATLSLSPG ERATLSC <u>RASQSVSSY</u> <u>LAWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>YDASNRAT</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTISLQP EDFAVYYC <u>HQYGSTPL</u> <u>TF</u> GGGTKAEIK
MM-151	P1X	HER1(EGFR)	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCASGGTFS <u>SYAI</u> <u>SWVRQAPGQGLEWMGSI</u> <u>IPIFGTVNYAQKFQGRV</u> TITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARD <u>PSV</u> <u>NLYWYFDL</u> WGRGTLTV SS	DIQMTQSPSTLSASVG DRVITTC <u>RASQSISSW</u> <u>WAWYQQKPGKAPKLLI</u> <u>YDASSLES</u> GVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQP DDFATYYC <u>QQYHAHPT</u> <u>TF</u> GGGTKVEIK
MM-151	P2X	HER1(EGFR)	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCASGGTFS <u>SYAI</u> <u>SWVRQAPGQGLEWMGSI</u> <u>IPIFGAANPAQKSQGRV</u> TITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCAK <u>MGRG</u> <u>KVAFDI</u> WGQGTMTVSS	DIVMTQSPDSLAVSLG ERATINC <u>KSSQSVLYS</u> <u>PNNKNYLAWYQQKPGQ</u> PPKLLIY <u>WASTRES</u> GV PDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYC <u>QQ</u> <u>YYGSPIT</u> FGGGTKVEI K

MM-151	P3X	HER1(EGFR)	QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYAFT <u>SYGI</u> NWVRQAPGQGLEWMGWI <u>SAYNGNTYYAQKLRGRV</u> TMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCAR <u>DLGG</u> <u>YGSQSVFPDP</u> WGQGTLV TVSS	EIVMTQSPATLSVSPG ERATLSC <u>RASQSVSSN</u> <u>LAWYQQKPGQAPRLLI</u> <u>YGASTRAT</u> GIPARFSG SGSGTEFTLTISLQ EDFAVYYC <u>QDYRTWPR</u> <u>RV</u> FGGGTKVEIK
TheraCIM	нимотузимаб	HER1(EGFR)	QVQLQSGAEVKKPGSS VKVSCKASGYTFT <u>NYI</u> YWVRQAPGQGLEWIGGI <u>NPTSGGSNENEKFKTRV</u> TITADESSTAYMELSS LRSEDATFYFCT <u>QGLW</u> <u>FDSQGRGFDF</u> WGQGTTV TVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITC <u>RSSQNI</u> VHS <u>NGNTYLD</u> WYQQTPGKA PKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVP SRFSGSGSGTDFTFTI SSLQPEDATYYCF <u>QY</u> <u>SHVPWT</u> FGGQTKLQIT
Vectibix™	панитумумаб	HER1(EGFR)	QVQLQESGPGLVKPSSET LSLTCTVSG <u>SVSSGDY</u> YWTWIRQSPGKGLEWIG <u>HIYYSGNT</u> NYNPSLKSR LTISIDTSKTQFSLKLS SVTAADTAIYYC <u>VRDRV</u> <u>TGAFDI</u> WGQGTMTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCQAS <u>QDISNY</u> LNWYQQKPGKAPKLLI <u>YDAS</u> NLETGVPSRFSG SGSGTDFTFTISLQ EDIATYFC <u>QHF</u> DHLPL <u>AF</u> GGGKVEIK
07D06		HER1(EGFR)	QIQLVQSGPELKKPGET VKISCKAS <u>GYTFTEYP</u> I HWVKQAPGKGFKWMGMI <u>YTDIGKP</u> TYAEEFKGRF AFSLETSASTAYLQINN LKNEDTATYFC <u>VRDRYD</u> <u>SLFDY</u> WGQGTTLTVSS	DVVMQTPLSLPVSLG DQASISCRSS <u>QSLVHS</u> <u>NGNTYL</u> HWYLQKPGQS PKLLIY <u>KVSNR</u> FSGVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFC <u>SQS</u> <u>THVPWT</u> FGGQTKLEIK
12D03		HER1(EGFR)	EMQLVESGGGFVKPGGS LKLSCAASGFAP <u>SHYDM</u> <u>SWVRQTPKQ</u> RLWVAYI <u>ASGGDITYYADTVKGRF</u> TISRDNQNTLYLQMSS LKSEDATAMFYCSR <u>SSYG</u> <u>NNGDALDF</u> WGQGTSVTV SS	DVVMQTPLSLPVSLG DQASISCRSS <u>QSLVHS</u> <u>NGNTYL</u> HWYLQKPGQS PKLLIY <u>KVSNRFS</u> GVP DRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYFC <u>SQS</u> <u>THVLT</u> FGSGTKLEIK
	C1	HER2	QVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTF <u>SYAM</u> <u>GWVRQAPGKLEWVSSI</u> <u>SGSSRYIYYADSVKGRF</u> TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCA <u>MDAS</u> <u>GSYFNF</u> WGQGTTLTVSS	QSPSFLSAFVGDRTIT TC <u>RASPGIRNYLAWYQ</u> QKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> T <u>LQS</u> GVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFAT YYC <u>QYNSYPLS</u> FGGG TKVEIK

Эрбицин		HER2	QVQLLQSAAEVKKPGES LKISCKGSGYSFT SYWI GWVRQMPGKGLEWMGII YPGDSDTRYSPSFQGV TISADKSI STAYLQWSS LKASDTAVYYCAR WRDS PLWGQGT LVTVSS	QAVVTQEPSFSVSPGG TVTLTC GLSSGSVSTS YYP SWYQQTPGQAPRT LIY STNTRSS GVPDRF SGSILGNKAALTI TGA QADDESDDYY CVLYMGS GQYV FGGGTKLTVL
Герцептин	трастузумаб	HER2	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAAS GFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVAR I YPTNGYTRY ADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMN LRAEDTAVYYC SRWGGD GFYAMDY WGQGTLVTVS S	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCRAS QDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLI Y SAS FLYSGVPSRFSG SRSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QQHYTTPP TFGQGT KVEIK
MAGH22	Маргетуксимаб	HER2	QVQLQQSGPELVKPGAS LKLSTAS GFNIKDTYI HWVKQRPQGLEWIGRI YPTNGYTRY DPKFQDKA TITADTSNTAYLQVSR LTSED TAVYYC SRWGGD GFYAMDY WGQASVTVS S	DIVMTQSHKFMSTSVG DRVSI TCKAS QDVNTA VAWYQQKPGHSPKLLI Y SAS FRYTGVDPDRFTG SRSGTDFTLTISLQV EDLAVYYC QQHYTTPP TFGGGT KVEIK
MM-302	F5	HER2	QVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTFR SIYAM SWVRQAPGKLEWVSAI SGRGDNTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYC AKMTSN AFAFDY WGQGTLVTVSS	QSVLTQPPSVSGAPGQ RVTISCT TGSSSNIGAG YGVH WYQQLPGTAPKL LIY GNTNRPS GVPDRF SGFKSGTSASLAITGL QAEDEADYYC QFYDSS LSGWV FGGGTKLTVL
Перьета	пертузумаб	HER2	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAAS GFTFDTYTM DWVRQAPGKGLEWVAD V NPNSGGS IYNQRFKGRF TISVDRSKNTLYLQMN LRAEDTAVYYC ARNLGP SFYFDY WGQGTLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCKAS QDVSIG VAWYQQKPGKAPKLLI Y SAS YRYTGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQP EDFATYYC QQYYIYPY TFGQGT KVEIK
MM-121/ SAR256212		HER3	EVQLLESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTFS HYVM AWVRQAPGKLEWVSSI SSSGGWTLYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCTR GLKM ATIFDY WGQGTLVTVSS	QSALTQPASVSGSPGQ SITISCT TGTSSDVGSY NVVS WYQQHPGKAPKL IIY EVSQRPS GVSNRF SGSKSGNTASLTISGL QTEDEADYYC CSYAGS SIFVI FGGGTKVTVL

MEHD7945A	дулиготумаб (duligotumab)	HER1(EGFR)/ HER3	EVQLVESGGGLVQPGGG LRLSCAASGFTLS GDWI HWVRQAPGKGLEWVGEI SAAGGYTDYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCAR ESRV SFEAMDYWGQGLVTV SS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC RASQNIATD VAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFRSG SGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYC QQSEPEPY TFGQGTKVEIK
MM-111		HER2/3	QVQLQESGGGLVKPGGG LRLSCAASGFTFS SYWM SWVRQAPGKGLEWVANI NRDGSASYVDSVKGRF TISRDDAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR DRGV GYFDLWGRGTLVTVSS	QSALTQPASVSGSPGQ SITISCT TGTSSDVGGY NFVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSDRPSGVSDRF SGSKSGNTASLIISGL QADDEADYYC SSYGSS STHVI FGGGTKVTVL
MM-111		HER2/3	QVQLVQSGAEVKKPGES LKISCKSGSGYSFT SYWI AWVRQMPGKGLEVMGLI YPGDSDTKYSPSFQGV TISVDKSVSTAYLQWSS LKPSDSAVYFCAR HDVG YCTDRTCAKWPEWLGW GQGLTVTVSS	QSVLTQPPSVSAAPGQ KVTISCT SGSSNIGNN YVSWYQQLPGTAPKLL IYDHTNRPA GVDRFS GSKSGTSASLAISGFR SEDEADYYC CASWDYTL SGWV FGGGTKLTVL
	Hu3S193	Антиген Y Льюиса	EVQLVESGGGVQPGRS LRLSCSTSGFTFS DYYM YWVRQAPGKGLEWVAYM SNVGAITDYPDTVKGRF TISRDNSTNTLFLQMDS LRPEDTGVYFCAR GTRD GSWFAYWGQGPVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTC RSSQRIVHS NGNTYLEWYQQTPGKA PKLLIYKVSNRFS GVP SRFSGSGSGTDFTFI SSLQPEDIAITYYC FQG SHVPFT FGQGTKLQIT
BAY 94-9343	анетумаб равтансин	Мезотелин	QVELVQSGAEVKKPGES LKISCKSG GSYFTSYWI GWVRQAPGKGLEWMGI DPGDSRT RYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYCC ARGQLY GGTYMDG WGQGLTVTVS S	DIALTPASVSGSPGQ SITISCTGT SSDIGGY NSVSWYQQHPGKAPKL MIYGVN NRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYC SSYDIE SATPV FGGGTKLTVL
	SS1	Мезотелин	QVQLQQSGPELEKPGAS VKISCKASGYSTGYTM NWKQSHGKSLEWIGLI TPYNGASSYNQKFRGKA TLTVDKSSSTAYMDLLS LTSEDSAVYFCARGGYD GRGFDYWGQGTTVTVSS	DIELTQSPAIMSASPG EKVTMTCSASSSVSYM HWYQQKSGTSPKRWIY DTSKLASGVPRFSGS SGSNSYSLTISSVEAE DDATYYCQQWSGYPLT FGAGTKLEIK

		Мезотелин	QVYLVESGGGVVQPGRS LRLSCAASGITFS <u>IYGM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVI</u> <u>WYDGSHEYADSVKGRF</u> TISRDNKNTLYLLMNS LRAED TAVYYCARD <u>GDY</u> <u>YDSGS</u> <u>PLDY</u> WGQGLTVTVSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC <u>RASQSVSSY</u> <u>LAWYQQKPGQAPRLI</u> <u>YDASNRAT</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYC <u>QQ</u> <u>RSNWPLT</u> FGGGTKVEI K
		Мезотелин	QVHLVESGGGVVQPGRS LRLSCVASGITFS <u>RIYGM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAVL</u> <u>WYDGSHEYADSVKGRF</u> TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAIYYCARD <u>GDY</u> <u>YDSGSPLDY</u> WGQGLTV VSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC <u>RASQSVSSY</u> <u>LAWYQQKPGQAPRLI</u> <u>YDASNRAT</u> GIPARFSG SGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYC <u>QQRSNWPL</u> <u>T</u> FGGGTKVEIK
		Мезотелин	EVHLVESGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTFS <u>RYWM</u> <u>SWVRQAQKGLEWVASI</u> <u>KQAGSEKTYVDSVKGRF</u> TISRDNKNSLSLQMNS LRAEDTAVYYCARE <u>GAY</u> <u>YYDSASYYPYYYYSMD</u> <u>V</u> WGQGTTVTVSS	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSC <u>RASQSVSSS</u> <u>YLA</u> WYQQKPGQAPRLI <u>IYGASSRAT</u> GIPDRFS SGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYC <u>QQYGS</u> <u>SO</u> <u>Y</u> TFGGQTKLEIK
MORAb-009	аматуксимаб	Мезотелин	QVQLQQSGPELEKPGAS VKISCKASGYSTF <u>GYTM</u> <u>NWVKQSHGKSLEWIGLI</u> <u>TPYNGASSYNQKFRGKA</u> TLTVDKSSSTAYMDLLS LTSEDSAVYFCAR <u>G</u> <u>GGYD</u> <u>GRGFDY</u> WGSGTPTVTVSS	DIELTQSPAISASPG EKVTMTCS <u>SASSSVSYM</u> <u>HWYQQKSGTSPKRWIY</u> <u>DTSKLAS</u> GVPGRFSGS SGSNSYSLTISSEAE DDATYYC <u>QQWSKHPLT</u> FGSGTKVEIK
hPAM4		MUC-1	EVQLQESGPGLVKPGAS VKMSCKASGYTFP <u>SYVL</u> <u>HWVKQKPGGQLEWIGYI</u> <u>NPYNDGTQYNEKFKGKA</u> TLTSDKSSSTAYMELSR LTSEDSAVYYCAR <u>G</u> <u>FGG</u> <u>SYGFAY</u> WGQGLTITVSA	DIVMTQSPAISASPG EKVTMTCS <u>SASSSVSSS</u> <u>YLYWYQQKPGSSPKLW</u> <u>IYSTNLAS</u> GVPARFS SGSGTSYSLTISSEAE AEDAASYFC <u>HQWNRYP</u> <u>Y</u> TFGGGTKLEIK
hPAM4-Cide	кливатузумаб	MUC1	QVQLQQSGAEVKKFGAS VKVSCEASGYTFP <u>SYVL</u> <u>HWVKQAPGQGLEWIGYI</u> <u>NPYNDGTQTNKKFKGKA</u> TLTRDTSINTAYMELSR LRSDDTAVYYCAR <u>G</u> <u>FGG</u> <u>SYGFAY</u> NGQGLTVTVSS	DIQLTQSPSSLSASVG DRVMTCS <u>SASSSVSSS</u> <u>YLYWYQQKPGKAPKLW</u> <u>IYSTNLAS</u> GVPARFS SGSGTDFTLTISLQ PEDSASYFC <u>HQWNRYP</u> <u>Y</u> TFGGGTRLEIK

SAR566658	huDS6v1 01	MUC1	QAQLQVSGAEVVKPGAS VKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGQGLEWIGYI YPGNGATNYNQKFGKKA TLTADTSSSTAYMQISS LTSEDSAVYFCARGDSV PFAYWGQGLVTVSA	EIVLTQSPATMSASPG ERVITITCSAHSSVSFM HWFQKPGTSPKLWIY STSSLASGVPARFGGS SGSTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQRSSFPLT FGAGTKLELK
Терагин	пемтумомаб muHMFg1	MUC1	QVQLVQSGAELMKPGAS VKISCKATGYTFSAYWI EWWKQRPBGHGLEWIGEI LPGSNNSRYNEKFKGKA TFTADTSSNTAYMQLSS LTSEDSAVYYCSRSYDF AWFAYWGQGLVTVSA	DIVMSQSPSSLAVSVG EKVTMSCKSSQSLLYS SNQKIYLAWYQKPGQ SPKLLIYWASTRESGV PDRFTGGSGTDFTLT ISSVKAEDLAVYYCQO YYRYPRTFGGGTKLEI K
Терекс	сонгузумаб huHMFg1 AS1402 R1150	MUC1	QVQLVQSGAEVVKPGAS VKVSCASGYTFSAYWI EWWVRQAPGKGLEWVGEI LPGSNNSRYNEKFKGRV TVTRDTSNTAYMELSS LRSEDTAVYYCARSYDF AWFAYWGQGLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCKSSQSLLYS SNQKIYLAWYQKPGK APKLLIYWASTRESGV PSRFGSGSGTDFTFT ISSLPEDIATYYCQO YYRYPRTFGQGTKVEI K
MDX-1105 или BMS-936559		PD-L1	QVQLVQSGAEVKKPGSS VKVSCKTSKDTFTYAI SWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGKAHYAQKFGGRV TITADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYFCARKFHF VSGSPFGMDVWGQTTV TVSS	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCKRASQSVSSY LAWYQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQQRSNWPT FGQGTKVEIK
MEDI-4736	дурвалумаб	PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSRYWM SWVRQAPGKGLEWVANI KQDGEKYYVDSVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAREGGW FGEIAFDYWGQGLVTV SS	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSCKRASQSVSS YLAWYQKPGQAPRLLI YDASNRATGIPDRFS SGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGLP WTFGQGTKVEIK
MPDL3280A	атезолизумаб	PD-L1	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSDSWI HWVRQAPGKGLEWVAWI SPYGGSTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCARRHWP GGFDYWGQGLVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCRASQDVSTA VAWYQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQF EDFATYYCQQYLYHPA TFGQGTKVEIK

MSB0010718C	авелумаб	PD-L1	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAAS <u>GFTFSSYIM</u> MWVRQAPGKGLEWVSSI <u>YPSGGIT</u> FYADTVKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCA <u>RIKLG</u> <u>TVTTVDY</u> WGQGLTVTVS S	QSALTQPASVSGSPGQ SITISCTGT <u>SSDVGGY</u> <u>NYVSWYQQHPGKAPKL</u> MIY <u>DVSNR</u> PSGVSNR SGSKSGNTASLTISGL QAEADADYYC <u>SSYTSS</u> <u>STRV</u> FGTGKVTVL
MLN591		PSMA	EVQLVQSGPEVKKPGAT VKISCKTS <u>GYTFTEYTI</u> <u>HWVKQAPGKLEWIGNI</u> <u>NPNNGGTTYNQKEDKA</u> TLTVDKSTDATMELSS LRSEDATVYYCA <u>GWNF</u> <u>DY</u> WGQGLTLTVSS	DIQMTQSPSSLSTSVG DRVTLTCK <u>KASQDVGTA</u> <u>VDWYQQKPGSPKLLI</u> <u>YWASTRHT</u> GIPSRFSG SGSGTDFTLTISLQ EDFADYYC <u>QOYNSYPL</u> <u>T</u> FGPGTKVDIK
MT112	пасотукси- зумаб	PSMA	QVQLVESGGGLVKPGES LRLSCAAS <u>GFTFSDYYM</u> YWVRQAPGKLEWVAI <u>I</u> <u>SDGGYYT</u> YYSDIKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LKAEDTAVYYC <u>ARGFPL</u> <u>LRHGAMDY</u> WGQGLTVTV SS	DIQMTQSPSSLASVG DRVITICKAS <u>QNVDTN</u> VAWYQQKPGQAPKSLI Y <u>SAS</u> YRYSADVPSRFSG SASGTDFTLTISVQS EDFATYYC <u>QOYDSYPY</u> <u>T</u> FGGGTKLEIK
		ROR1	QEQLVESGGRLVTPGGS LTLSCASGDFDS <u>AYYM</u> <u>SWVRQAPGKLEWIATI</u> <u>YPSGKTYATWVNGRF</u> TISSDNAQNTVDLQMNS LTAADRATYFCAR <u>DSYA</u> <u>DDGALFNI</u> WGPGTLVTI SS	ELVLTQSPSVSAALGS PAKITCT <u>TLSSAHKTD</u> <u>IDWYQQ</u> LQGEAPRYLM QVQSD <u>GSYTKRP</u> GVDP RFGSGSSGADRYLIIP SVQADDEADYYC <u>GADY</u> <u>IGGYV</u> FGGGTQLTVTG SS
		ROR1	EVKLVESGGGLVKPGGS LKLSCAASGFTFS <u>SYAM</u> <u>SWVRQIPEKRLWVASI</u> <u>SRGGTTYPSVKGRFT</u> ISRDNVRNLYLQMSL RSEDATAMYYCGR <u>YDYG</u> <u>YYAMDY</u> WGQGSVTVSS	DIKMTQSPSSMYASLG ERVITICKAS <u>PDINSY</u> <u>LSWFQQKPGKSPKTLI</u> Y <u>RANRLVD</u> GVPSRFSG GGSGQDYSLTINSLEY EDMGIYYC <u>LOYDEFPY</u> <u>T</u> FGGGTKLEMK
		ROR1	QSLVESGGRLVTPGTPL TLTCTVSGIDLNS <u>SHWMS</u> WVRQAPGKLEWIG <u>IIA</u> <u>ASGSTYYANWAKGRFTI</u> SKTSTTVDLRIASPTTE DTATYFCAR <u>DYGDYRLV</u> <u>TFNI</u> WGPGTLTVTVSS	ELVMTQTPSSVSAAVG GTVTINC <u>QASQSIGSY</u> <u>LAWYQQKPGQPPKLLI</u> Y <u>YASNLAS</u> GVPSRFSG SGSGTEYTLTISGVQR EDAATYYC <u>LGSLNSND</u> <u>NV</u> FGGGTELEIL
		ROR1	QSVKESEGLVTPAGNL TLTCTASGSDIND <u>YPIS</u> WVRQAPGKLEWIG <u>FIN</u> <u>SGGSTWYASWVKGRFTI</u> SRTSTTVDLKMTSLTTD DTATYFCAR <u>GYSTYYCD</u> <u>FNI</u> WGPGTLTVTVSS	ELVMTQTPSSVSAAGV GTVTINC <u>QASQSIDSN</u> <u>LAWFQQKPGQPPKLLI</u> Y <u>RASNLAS</u> GVPSRFSG SRSGTEYTLTISGVQR EDAATYYC <u>LGGVGNVS</u> <u>YRTS</u> FGGGTEVVVK
CC49 (гуманизиров.)		TAG-72	QVQLVQSGAEVVKPGAS VKISCKASGYTFT <u>DHAI</u> <u>HWVKQNPGRLEWIGYF</u> <u>SPGNDDFKYNERFKGKA</u> TLTADTSASTAYVELSS LRSEDATVYFCTR <u>SLNM</u> <u>AY</u> WGQGLTVTVSS	DIVMSQSPDSLAVSLG ERVTLNCKSS <u>QSLLYS</u> <u>CNQKNYLA</u> WYQQKPGQ SPKLLIY <u>WASARES</u> GV PDRFSGSGSGTDFTLT ISSVQAEDVAVYYC <u>QQ</u> <u>YYSYPLT</u> FGAGTKLEL K
	мышинное A1	TPBG/5T4	QIQLVQSGPELKKPGET VKISCKAS <u>GYTFTNFGM</u> <u>NWVKQGPGEGLKWMGWI</u> <u>NTNTGEPYAEFEKGRX</u> AFSLETTASTAYLQINN LKNEEDATYFCAR <u>DWDG</u> <u>AYFFDY</u> WGQGTTLTVSS	SIVMTQTPKFLVLSAG DRVITICKAS <u>QSVSND</u> <u>VAWYQQKPGQSPKLLI</u> N <u>FATNRYT</u> GVPNRFTG SGYGTDFTFITVQA EDLALYFC <u>QOYSSPW</u> <u>T</u> FGGGTKLEIK

	мышинное A2	TPBG/5T4	QVQLQQSRPELVKPGAS VKMSCKAS GYTF TDYVI SWVK QRTGQGLEWIG EI YPGSNSIYYNEKFKGRA TLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYFCAM GGNY GFDY WGQGTTLTVSS	SVIMSRGQIVLTQSPA IMSASLGERVTLTCT TA SSSVNSNYLHWYQ QKP GSSPKLWIY STSNLAS GVPARFSGSGSGTSYS LTISSEMEADAATYYC HQYHRSPLT FGAGTKL ELK
	мышинное A3	TPBG/5T4	EVQLVESGGGLVQPKGS LKLSCAAS GFTFNTYAM NWVRQ APGKGLEW VARI RSKSNNYATYYADSVKD RFTISRDDSQSMYLYQM NNLKTEDTAMYXCVR QW DYDVRAMNY WGQTSVT VSS	DIVMTQSHIFMSTSVG DRVSITC KASQD VDTA VAWYQ QKPGQSPKLLI YWASTRLT GVDPDRFTG SGSGTDFTLTISNVQS EDLADYFC QQYSSYPY TFGGG TKLEIK
IMMU-132	hRS-7	TROP-2	QVQLQQSGSELKKPGAS VKVSCKASGYT FTNYGM NWVKQ APGQGLKWM GWI NTYTGEPTYTDDFKGRF AFSLDTSVSTAYLQISS LKADDTAVYFCAR GGFG SSYWYFDV WGQGLVTV SS	DIQLTQSPSSLSASVG DRVSITC KASQD VSIA VAWYQ QKPGKAPKLLI YSASYRYT GVDPDRFSG SGSGTDFTLTISLQP EDFAVYYC QQHYITPL TFGAG TKVEIK
IMC-18F1	икркумаб	VEGFR1	QAQVVESGGGVVQSGRS LRLSCAAS GFAFSSYGM HWVRQ APGKGLEW VAVI WYDGSNKYYADSVGRF TISRDNSENTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR DHYG SGVHHYFYGLDV WGQ TTVTSS	EIVLTQSPGTLTSLSPG ERATLSC RASQSVSSS YLAWYQ QKPGQAPRLL IYGASSRAT GIPDRFS SGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYC QQYGSSP LTFGGG TKVEIK
Цирамза	рамуцирумаб	VEGFR2	EVQLVQSGGGLVQPGGS LRLSCAAS GFTFSSYSM NWVRQ APGKGLEW VSSI SSSSSYIYYADSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAR VTDA FDI WGQGMVTVSSA	DIQMTQSPSSVSASIG DRVITC RASQ GIDNW LGWYQ QKPGKAPKLLI YDASNLD TGVPSRFSG SGSGTYFTLTISLQA EDFAVYFC QQA KAFPP TFGGG TKVDIK
gl65DFM-PEG	алацизумаб пегол	VEGFR2	EVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAAS GFTFSSYGM SWVRQ APGKGLEW VATI TSGGSYTY YVDSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYC VRIGED ALDY WGQGTTLTVSS	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITC RASQ DIAGS LNWLQ QKPGKAIRKLI YATSLD SGVPKRFSG SRSGSDYTLTISLQP EDFATYYC LQYGSFPP TFGQGT KVEIK
Imclone6.64		VEGFR2	KVQLQQSGTELKPGAS VKVSCKASGYIFTEYII HWVKQRSQGLEWIGWL YPESNIIKYNEKFKDKA TLTADKSSSTVYMELSR LTSEDSAVYFCTRHDGT NFDYWGQGTTLTVSSA	DIVLTQSPASLAVSLG QRATISCRASEVDSY GNSFMHWYQKPGQPP KLLIYRASNLESGIPA RFGSGSRTDFTLTIN PVEADDVATYYCQSN EDPLTFGAGTKLELK

* Подчеркнутые и выделенные жирным шрифтом последовательно-сти, если присутствуют, представляют собой CDR в пределах VL и VH.

TPBG означает гликопротеин трофобластов.

Методы измерения аффинности связывания и/или другой биологической активности заявленных композиций по изобретению могут представлять собой методы, изложенные в данном описании, или методы, общеизвестные в данной области техники. Например, аффинность связывания связывающейся пары (например, антитела и антигена), обозначенную как K_d , можно определить, используя различные подходящие анализы, включая, но не ограничиваясь этим, анализы связывания с использованием радиоактивных веществ, анализы связывания с использованием нерадиоактивных веществ, такие как резонансный перенос энергии флуоресценции и поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Biacore), и иммуноферментные твердофазные анализы (ELISA), анализ кинетического исключения (KinExA®) или так, как описано в разделе Примеры. Увеличение или уменьшение аффинности связывания, например, химерного полипептидного комплекса, который расщеплен с целью удаления объемной группировки, по сравнению с химерным полипептидным комплексом с присоединенной объемной группировкой, может быть определено путем измерения аффинности связывания химерного полипептидного комплекса с его целевым партнером по связыванию с объемной группировкой и без нее.

Измерение периода полувыведения для заявленного химерного комплекса может быть выполнено различными подходящими методами. Например, для возможного определения периода полувыведения вещества необходимо ввести данное вещество субъекту и периодически проводить отбор биологическо-

го образца (например, биологической жидкости, такой как кровь, или плазма крови, или асцитическая жидкость), чтобы определить концентрацию и/или количество этого вещества в образце во времени. Концентрацию вещества в биологическом образце можно определить, используя различные подходящие методы, включая иммуноферментные твердофазные анализы (ELISA), методы иммуноблоттинга и хроматографии, в том числе жидкостной хроматографии высокого давления и жидкостной экспресс-хроматографии белков. В некоторых случаях вещество может быть помечено детектируемой меткой, такой как радиоактивная метка или флуоресцентная метка, которую можно использовать для определения концентрации вещества в образце (например, образце крови или образце плазмы крови). Затем на основании результатов, которые могут быть получены с использованием пакетов программ, таких как программное обеспечение SoftMax Pro, или путем выполнения вычислений вручную, известных в данной области техники, определяют различные фармакокинетические параметры.

Помимо этого, физико-химические свойства композиций химерного полипептидного комплекса могут быть измерены с целью установления степени растворимости, структуры и сохранения стабильности. Проводят анализы заявленных композиций, позволяющие определить характеристики по связыванию для связывающих доменов по отношению к лиганду, включая характеризующую связывание константу диссоциации (K_d , K_{on} и K_{off}), полупериод существования лиганд-рецепторного комплекса, а также активность связывающего домена в отношении ингибирования биологической активности секвестрированного лиганда по сравнению со свободным лигандом (по значениям IC_{50}). Термин " IC_{50} " относится к концентрации, необходимой для ингибирования половины максимального биологического ответа агониста лиганда, и обычно ее определяют в анализах конкурентного связывания. Термин " EC_{50} " относится к концентрации, необходимой для достижения половины максимального биологического ответа активного вещества, и обычно ее определяют посредством ELISA или в анализах с применением клеток, включая методы из примеров, описанных в данном изобретении.

(1) Связывающие домены антитела к CD3.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с Т-клетками. В одном из воплощений связывающий домен второй части содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к антигену CD3. В другом воплощении связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к CD3-эпсилон и CD3-дельта. В данной области техники известны моноклональные антитела к CD3-неу. Типичные неограничивающие примеры последовательностей VL и VH моноклональных антител к CD3 представлены в табл. 1. В одном из воплощений изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, содержащий связывающий домен с аффинностью связывания с CD3, содержащий последовательности VL и VH антитела к CD3, приведенные в табл. 1. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, содержащий связывающий домен первой части с аффинностью связывания с CD3-эпсилон, содержащий последовательности VL и VH антитела к CD3-эпсилон, приведенные в табл. 1. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, в которой второй связывающий домен scFv первой части содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела к CD3, huUCHT1, из табл. 1. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен с аффинностью связывания с CD3, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH антитела к CD3, приведенных в табл. 1. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен с аффинностью связывания с CD3, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом последовательности CDR представляют собой RASQDIRNYLN, YTSRLES, QQGNTLPWT, GYSFTGYTMN, LINPYKGVST и SGYYGDSWDYFDV.

CD3-комплекс представляет собой группу молекул на клеточной поверхности, которая ассоциирована с Т-клеточным рецептором для распознавания антигенов (TCR) и функционирует в случае экспрессии TCR на поверхности клеток и в каскаде передачи сигнала, который возникает, когда лиганд, представляющий собой комплекс пептид:МНС, связывается с TCR. Обычно, после связывания антигена с Т-клеточным рецептором CD3 посылает сигналы через клеточную мембрану в цитоплазму внутрь Т-клетки. Это приводит к активации Т-клетки, которая начинает быстро делиться с образованием новых Т-клеток, сенсibilизированных для атаки конкретного антигена, с которым взаимодействовал TCR. CD3-комплекс состоит из молекулы CD3-эпсилон наряду с четырьмя другими мембраносвязанными полипептидами (CD3-гамма, -дельта, -дзета и -бета). У людей CD3-эпсилон кодируется геном CD3E на 11-й хромосоме. Внутриклеточные домены каждой из цепей CD3 содержат иммунорецепторные тирозин-содержащие активирующие мотивы (ITAM), которые служат в качестве начальной точки механизма внутриклеточной передачи сигнала после контактирования с Т-клеточным рецептором.

В ряде терапевтических стратегий модулирование Т-клеточного иммунитета осуществляется по-

средством направленного воздействия на TCR-опосредуемую передачу сигнала, в частности, это относится к моноклональным антителам (mAb) к CD3 человека, которые находят широкое клиническое применение в схемах лечения иммуносупрессивными средствами. CD3-специфичное мышинное mAb OKT3 было первым mAb, разрешенным к применению на людях (Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology*, 105: 23-29, 1995), и в настоящее время широко используется в клиниках в качестве иммуносупрессивного агента при трансплантации (Chatenoud, *Clin. Transplant*, 7: 422-430, (1993); Chatenoud, *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 123-132 (2003); Kumar, *Transplant. Proc.*, 30: 1351-1352 (1998)), диабете 1 типа и псориазе. Важно отметить, что mAb к CD3 могут индуцировать частичную опосредованную Т-клетками передачу сигнала и клональную толерантность (Smith JA, Nonmitogenic Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Deliver a Partial T Cell Receptor Signal and Induce Clonal Anergy. *J. Exp. Med.*, 185: 1413-1422 (1997)). OKT3 описывается в литературе как Т-клеточный митоген, а также как сильнодействующий Т-клеточный киллер (Wong JT. The mechanism of anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation of cytolysis by inter-T cell bridging. *Transplantation*, 50: 683-689 (1990)). В частности, в исследованиях Wong продемонстрировано, что посредством соединения CD3-содержащих Т-клеток и клеток-мишеней можно добиться цитолиза мишени и что ни FcR(Fc-рецептор)-опосредуемая ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность), ни связывание комплемента не является необходимым для лизиса клеток-мишеней под действием бивалентного mAb к CD3.

OKT3 проявляет как митогенную активность, так и активность, вызывающую цитоллиз Т-клеток, зависимым от времени образом: вслед за ранней активацией Т-клеток, приводящей к высвобождению цитокинов, при дальнейшем введении OKT3 позже блокирует все известные Т-клеточные функции. Именно благодаря такому более позднему блокированию Т-клеточной функции, антитело OKT3 нашло такое широкое применение в качестве иммуносупрессора в режимах лечения для уменьшения или даже аннулирования отторжения тканевого аллотрансплантата. Другие антитела, специфичные к молекуле CD3, описаны в Tunnacliffe, *Int. Immunol.*, 1 (1989), 546-50. В WO2005/118635 и WO2007/033230 описываются моноклональные антитела к CD3-эпсилон человека, в патенте Соединенных Штатов Америки 5821337 описываются последовательности VL и VH мышинного моноклонального Ab к CD3, UCHT1 (mucCD3, Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175, 217-225 (1992)) и гуманизированного варианта этого антитела (huUCHT1), а в патентной заявке Соединенных Штатов Америки 20120034228 описываются связывающие домены, способные связываться с эпитопом цепи CD3-эпсилон человека и примата, не являющегося шимпанзе.

(2) Связывающие домены антитела к EpCAM.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером EpCAM. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к EpCAM. Моноклональные антитела к EpCAM известны в данной области техники. Типичные неограничивающие примеры моноклональных антител к EpCAM и последовательностей их VL и VH представлены в табл. 2. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером EpCAM, содержащий последовательности VL и VH антитела к EpCAM, приведенные в табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, в которой первый связывающий домен первой части содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела к EpCAM, 4D5MUCB, из табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH, приведенных в табл. 2.

Молекула адгезии эпителиальных клеток (EpCAM, также известная как антиген 17-1A) представляет собой имеющий молекулярную массу 40 кДа интегрированный в мембрану гликопротеин, составленный из 314 аминокислот, экспрессируемый в некоторых видах эпителиальной ткани и многих разновидностях карциномы человека (см. Balzar, *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*, *J. Mol. Med.*, 1999, 77: 699-712). Первоначально EpCAM был обнаружен при использовании мышинного моноклонального антитела к 17-1A/эдреколомаба, которое было создано посредством иммунизации мышей раковыми клетками толстой кишки (Goettlinger, *Int. J. Cancer*, 1986, 38, 47-53 и Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 2755-2759). Ввиду своего происхождения из эпителиальных клеток опухолевые клетки большей части карцином экспрессируют EpCAM на своей поверхности (в большей степени, чем нормальные, здоровые клетки), включая большинство разновидностей клеток первичного, метастатического и диссеминированного немелкоклеточного рака легкого (Passlick B., et al. The 17-1A antigen is expressed on primary, metastatic and disseminated non-small cell lung carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 87(4): 548-552, 2000), аденокарцином желудка и гастроэзофагеального перехода (Martin I.G. Expression of the 17-1A antigen in gastric and gastro-oesophageal junction adenocarcinomas: a potential immunotherapeutic target. *J. Clin. Pathol.* 1999, 52: 701-704) и рака молочной железы и толстой и прямой кишки (Packeisen J. et al. Detection of surface antigen

17-1A in breast and colorectal cancer. *Hybridoma*, 1999, 18(1): 37-40), и поэтому EpCAM представляют собой привлекательную мишень для иммунотерапевтических подходов. Действительно, усиленная экспрессия EpCAM коррелирует с повышенной пролиферацией эпителиальных клеток; при раке молочной железы сверхэкспрессия EpCAM на опухолевых клетках является прогностическим фактором выживаемости (Gastl, *Lancet*, 2000, 356, 1981-1982). Ввиду своего происхождения из эпителиальных клеток опухолевые клетки большей части карцином экспрессируют EpCAM на своей поверхности, и композиция на основе биспецифичного одноцепочечного антитела солитомаба, которое направлено на EpCAM на опухолевых клетках и также содержит CD3-связывающий участок, была предложена для применения против клеточных линий первичных карциносарком (CS) матки и яичников (Ferrari F. et al. Solitomab, an EpCAM/CD3 bispecific antibody construct (BiTE®), is highly active against primary uterine and ovarian carcinoma cell lines in vitro. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2015, 34: 123).

В данной области техники известны моноклональные антитела к EpCAM. Моноклональные антитела к EpCAM, ING-1, 3622W94, адекватумумаб и эдреколомаб, описаны как антитела, протестированные на пациентах-людях (Münz, M. Side-by-side analysis of five clinically tested anti-EpCAM monoclonal antibodies. *Cancer Cell International*, 10: 44-56, 2010). Также были описаны биспецифичные антитела, направленные на EpCAM и на CD3, включающие конструкцию из двух разных биспецифичных антител, полученную посредством слияния гибридомы, продуцирующей моноклональное антитело к EpCAM, с одной из двух гибридом OKT3 и 9.3 (Möller S.A., Reisfeld R.A. Bispecific-monoclonal-antibody-directed lysis of ovarian carcinoma cells by activated human T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 33: 210-216, 1991). Другие примеры биспецифичных антител к EpCAM включают BiUII (анти-CD3 (крыса) × анти-EpCAM (мышь)) (Zeidler, J. *Immunol.*, 1999, 163: 1247-1252), scFv CD3/17-1A-биспецифичное (Mack M. A small bispecific antibody composition expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, 92: 7021-7025) и частично гуманизированное биспецифичное диатело, обладающее анти-CD3- и анти-EpCAM-специфичностью (Helfrich W. Construction and characterization of a bispecific diabody for retargeting T cells to human carcinomas. *Int. J. Cancer*, 1998, 76: 232-239).

В одном из воплощений согласно данному изобретению предложены биспецифичные композиции химерного полипептидного комплекса с первой частью, имеющей связывающий домен, обладающий специфичностью к EpCAM, и связывающий домен, обладающий специфичностью к CD3. Техническая проблема, требующая разрешения, заключалась в разработке средств и способов создания улучшенных композиций, демонстрирующих свойства хорошо переносимых и более удобных лекарственных средств (с менее частым введением) для эффективного лечения и/или для уменьшения интенсивности симптомов связанных с опухолями заболеваний. Решение указанной технической проблемы достигается путем использования воплощений, описанных в данном изобретении и охарактеризованных в формуле изобретения.

Соответственно, в некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к композициям химерного полипептидного комплекса, при этом указанная композиция содержит первую часть, содержащую композицию на основе биспецифичного одноцепочечного антитела, содержащую по меньшей мере два связывающих домена, при этом один из указанных доменов связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3, а второй домен связывается с антигеном EpCAM, при этом указанные связывающие домены содержат VL и VH, обладающие специфичностью к EpCAM, и VL и VH, обладающие специфичностью к антигену CD3 человека. Предпочтительно, чтобы в данном воплощении указанный связывающий домен, обладающий специфичностью к EpCAM, имел значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*. В одном из упомянутых выше воплощений связывающие домены находятся в формате scFv. В еще одном из упомянутых выше воплощений связывающие домены находятся в формате одноцепочечных диател.

(3) Связывающие домены антитела к CCR5.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером CCR5, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к CCR5. Моноклональные антитела к CCR5 известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером CCR5, содержащий последовательности VL и VH антитела к CCR5. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(4) Связывающие домены антитела к CD19.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером CD19, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к CD19. Моноклональные антитела к CD19 известны в данной области техники. Типичные неограничивающие примеры последовательностей VL и VH представлены в табл. 2. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером CD19, содержащий последовательности VL и VH антитела к CD19, приведенные в табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, в которой второй связывающий домен scFv содержит VH- и VL-области, при этом каждая из VH- и VL-областей демонстрирует по меньшей мере примерно 90, или 91, или 92, или 93, или 94, или 95, или 96, или 97, или 98, или 99% идентичность либо идентична парным последовательностям VL и VH антитела к CD19, MT103, из табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH, приведенных в табл. 2. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(5) Связывающие домены антитела к HER-2.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером HER-2, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к HER-2. Моноклональные антитела к HER-2 известны в данной области техники. Типичные неограничивающие примеры последовательностей VL и VH представлены в табл. 2. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером HER-2, содержащий последовательности VL и VH антитела к HER-2, приведенные в табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH, приведенных в табл. 2. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(6) Связывающие домены антитела к HER-3.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером HER-3, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к HER-3. Моноклональные антитела к HER-3 известны в данной области техники. Типичные неограничивающие примеры последовательностей VL и VH представлены в табл. 2. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером HER-3, содержащий последовательности VL и VH антитела к HER-3, приведенные в табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH, приведенных в табл. 2. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(7) Связывающие домены антитела к HER-4.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером HER-4, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к HER-4. Моноклональные антитела к HER-4 известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером HER-4, содержащий последовательности VL и VH антитела к HER-4. В другом

ных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(47) Связывающие домены антитела к сialiрированному антигену Тп.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как сталированный антиген Тп, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к сialiрированному антигену Тп. Моноклональные антитела к сialiрированному антигену Тп известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - сталированным антигеном Тп, содержащий последовательности VL и VH антитела к сialiрированному антигену Тп. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(48) Связывающие домены антитела к FAP.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как антиген активации фибробластов (FAP), и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к FAP. Моноклональные антитела к FAP известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером FAP, содержащий последовательности VL и VH антитела к FAP. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(49) Связывающие домены антитела к CD248.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером эндосиалином (CD248), и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к CD248. Моноклональные антитела к CD248 известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером CD248, содержащий последовательности VL и VH антитела к CD248. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(50) Связывающие домены антитела к EGFRvIII.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к EGFRvIII. Моноклональные антитела к EGFRvIII известны в данной области техники. Типичные неограничивающие примеры последовательностей VL и VH представлены в табл. 2. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером EGFRvIII, содержащий последовательности VL и VH антитела к EGFRvIII, приведенные в табл. 2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок

сти с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH, приведенных в табл. 2. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(55) Связывающие домены антитела к антигену TF.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - опухолеассоциированным антигеном, таким как антиген Томсена-Фриденрайха (антиген TF), и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к антигену TF. Моноклональные антитела к антигену TF известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - антигеном TF, содержащий последовательности VL и VH антитела к антигену TF. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(56) Связывающие домены антитела к IGF-IR.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - опухолеассоциированным антигеном, таким как рецептор инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к IGF-IR. Моноклональные антитела к IGF-IR известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером IGF-IR, содержащий последовательности VL и VH антитела к IGF-IR. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(57) Связывающие домены антитела к антигену Coга.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - опухолеассоциированным антигеном, таким как антиген Coга, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к антигену Coга. Моноклональные антитела к антигену Coга известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - антигеном Coга, содержащий последовательности VL и VH антитела к антигену Coга. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(58) Связывающие домены антитела к CD7.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как опухолеассоциированный антиген CD7, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к CD7. Моноклональные антитела к CD7 известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером CD7, содержащий последовательности

части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером G250, содержащий последовательности VL и VH антитела к G250. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(63) Связывающие домены антитела к MT-MMP.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как опухолессоциированный антиген MT-MMP, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к MT-MMP. Моноклональные антитела к MT-MMP известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером MT-MMP, содержащий последовательности VL и VH антитела к MT-MMP. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(64) Связывающие домены антитела к антигену F19.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как опухолессоциированный антиген F19, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к антигену F19. Моноклональные антитела к антигену F19 известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - антигеном F19, содержащий последовательности VL и VH антитела к антигену F19. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

(65) Связывающие домены антитела к рецептору EphA2.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, таким как опухолессоциированный антиген - рецептор EphA2, и второй связывающий домен, который связывается с антигеном эффекторной клетки, таким как антиген CD3. В одном из воплощений связывающий домен содержит VL и VH, происходящие из моноклонального антитела к рецептору EphA2. Моноклональные антитела к рецептору EphA2 известны в данной области техники. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером - рецептором EphA2, содержащий последовательности VL и VH антитела к рецептору EphA2. В другом воплощении изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая связывающий домен первой части с аффинностью связывания с опухолеспецифическим маркером, содержащий участок CDR-L1, участок CDR-L2, участок CDR-L3, участок CDR-H1, участок CDR-H2 и участок CDR-H3, при этом каждый из них происходит из соответствующих последовательностей VL и VH. Предпочтительно, чтобы в данных воплощениях указанное связывание имело значение K_d более чем 10^{-7} - 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

В частности, предполагается, что композиция химерного полипептидного комплекса может содержать любой из указанных выше связывающих доменов или вариантов их последовательности при условии, что варианты демонстрируют специфичность связывания в отношении описанного антигена. В одном из воплощений вариант последовательности может быть создан путем замены аминокислоты в последовательности VL или VH на другую аминокислоту. В вариантах с делециями один или более аминокислотных остатков в последовательности VL или VH, как описано в данном изобретении, удалены. Ввиду этого, варианты с делециями включают все фрагменты полипептидной последовательности свя-

звующего домена. В вариантах с заменами один или более аминокислотных остатков полипептида VL или VH (или CDR) удалены и заменены на альтернативные остатки. Согласно одному из аспектов данные замены являются консервативными по своему характеру, и консервативные замены этого типа хорошо известны в данной области техники. Помимо этого предполагается, в частности, что композиции, содержащие первый и второй связывающие домены, описанные в данном изобретении, могут быть использованы в любом из способов, описанных в данном изобретении.

2. Отделяемый сегмент.

Согласно другому аспекту изобретение относится к композициям химерного полипептидного комплекса, имеющим в своем составе пептидные последовательности отделяемого сегмента (RS), способные расщепляться одной или несколькими протеазами млекопитающих, причем при воздействии на RS протеазы (или протеаз) этот RS расщепляется и из композиции высвобождаются биспецифично связывающие домены. В результате высвобождения биспецифично связывающих доменов и экранирующей объемной группировки заявленных композиций химерного полипептидного комплекса, связывающие домены полностью восстанавливают, благодаря устранению экранирующего эффекта объемной группировки, свою способность одновременно связываться с эффекторной Т-клеткой и раковой, опухолевой клеткой или клеткой-мишенью, вызывая повреждение или цитоллиз раковой, опухолевой клетки или клетки-мишени.

В некоторых воплощениях согласно изобретению предложена композиция химерного полипептидного комплекса, представляющая собой единый слитый белок, содержащий в качестве своей части бифункциональный связывающий домен, связывающую группировку, такую как XTEN, и встроенный пептидный RS, который представляет собой субстрат для одной или нескольких протеаз, ассоциированных с тканью-мишенью, при этом RS присоединен рекомбинантным путем к концу объемной группировки и RS присоединен рекомбинантным путем к первой части, содержащей первый и второй связывающие домены; таким образом, RS располагается между первой частью и XTEN или другой объемной группировкой.

В воплощениях по изобретению предложена композиция химерного полипептидного комплекса, содержащая один или несколько RS, которые представляют собой субстрат для протеазы, ассоциированной с пораженной заболеванием тканью-мишенью у субъекта; неограничивающими примерами мишеней являются рак, опухоль либо ткани или органы, вовлеченные в пролиферативное расстройство или воспалительное заболевание. Цель изобретения заключается в разработке RS, специально сконструированного для применения в композициях химерного полипептидного комплекса, содержащих биспецифично связывающие домены, вследствие чего связывающие домены высвобождаются из такой композиции, когда композиция, содержащая RS, находится вблизи протеазы, ассоциированной с тканью-мишенью. Структура композиций химерного полипептидного комплекса является такой, что полученный высвободившийся компонент, содержащий связывающие домены, обладает улучшенной способностью экстравазировать и присоединяться к ткани-мишени или проникать в нее, независимо от того, происходит ли это благодаря уменьшению молекулярной массы полученного фрагмента или благодаря снижению стерических затруднений, оказываемых фланкирующей объемной группировкой (например, XTEN), которая отщепляется.

Строма в карциномах человека состоит из внеклеточного матрикса и клеток различных типов, не относящихся к карциноме, таких как лейкоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты и миофибробласты. Опухолеассоциированная строма активно поддерживает рост опухоли, стимулируя неоангиогенез, а также пролиферацию и инвазию в окружающие карциному клетки. Стромальные фибробласты, часто называемые ассоциированными с раком фибробластами (CAF), играют, в частности, важную роль в прогрессировании опухолей вследствие своей способности динамично модифицировать состав внеклеточного матрикса (ECM), облегчая тем самым инвазию опухолевых клеток и последующую колонизацию метастазирующими клетками. В частности, в данной области техники известно, что протеазы являются важными компонентами, которые вносят вклад в прогрессирование злокачественных опухолей, включая опухолевый ангиогенез, инвазию опухолей, ремоделирование внеклеточного матрикса и метастазирование, причем протеазы функционируют как часть обширной разнонаправленной сети протеолитических взаимодействий. Необходимым условием развития злокачественных опухолей является их способность приобретать сосудистую систему, чтобы проникать в окружающие нормальные ткани и диссеминировать в отдаленные участки; развитие опухоли в значительной степени зависит от повышенной экспрессии внеклеточных эндопротеаз из многочисленных классов ферментов, например, металлопротеаз (ММП) и сериновых, треониновых, цистеиновых и аспарагиновых протеаз. Однако роль протеаз не ограничивается тканевой инвазией и тканевым ангиогенезом; эти ферменты также играют главную роль в активации ростовых факторов, клеточной адгезии, выживаемости клеток и в иммунологическом надзоре. Например, ММП способны влиять на поведение опухолевых клеток вследствие своей способности расщеплять ростовые факторы, рецепторы клеточной поверхности, молекулы клеточной адгезии или хемокины. В совокупности, действия опухолеассоциированных протеаз представляют значительную силу в фенотипическом развитии рака.

Поскольку имеется большое число данных, демонстрирующих по-разному протекающую экспрес-

сию многих таких протеолитических ферментов в нормальной и опухолевой тканях, в частности, предполагается, что такую по-разному протекающую экспрессию можно использовать в качестве средства для активации заявленных композиций, находящихся в непосредственной близости от опухоли. В связи с этим, сериновые протеазы и, в особенности, металлопротеазы являются кандидатами для направленной, избирательной лекарственной доставки заявленной композиции благодаря как своей повышенной активности во внеклеточном окружении опухоли, так и своей способности избирательно и специфично расщеплять короткие пептидные последовательности RS, что приводит к получению высоких уровней активной первой части заявленной композиции в опухоли и низких уровней интактной композиции химерного полипептидного комплекса в нормальных здоровых тканях. Вследствие избирательной доставки композиции химерного полипептидного комплекса наблюдается как одновременное снижение необходимой активности или дозы этих агентов, так и снижение токсичности в отношении нормальных тканей, включая печень, сердце и костный мозг, что тем самым значительно улучшает терапевтический индекс композиций химерного полипептидного комплекса. В частности, предполагается, что описанные композиции обладают благоприятными свойствами в плане этой пролекарственной концепции, заключающимися в том, что, среди других свойств, в нерасщепленном состоянии они проявляют сниженную аффинность связывания со своими соответствующими лигандами и что они претерпевают ослабленную экстравазацию в нормальных, здоровых тканях, но в результате расщепления приобретают улучшенную способность экстравазировать, проникать в опухоль и обладают более высокой аффинностью связывания со своими соответствующими лигандами; все это вносит вклад в повышение терапевтического индекса и ослабление побочных эффектов заявленных композиций.

В некоторых воплощениях изобретение включает композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие RS, при этом когда такая композиция расщепляется под действием протеаз(ы), ассоциированных(ой) с тканью-мишенью, с высвобождением фрагмента, содержащего связывающие домены первой части, тогда этот фрагмент способен проникать внутрь указанной ткани-мишени, такой как опухоль, с достижением концентрации, по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз более высокой, чем в случае композиции, которая не подвергается расщеплению. В других воплощениях изобретение включает композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие RS, при этом когда такая композиция расщепляется под действием протеазы, ассоциированной с тканью-мишенью, с высвобождением фрагмента, содержащего связывающие домены первой части, тогда этот фрагмент, содержащий связывающие домены первой части, способен проникать внутрь указанной ткани со скоростью, по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз более высокой, чем в случае композиции, не содержащей RS. В одном из воплощений изобретение включает композицию химерного полипептидного комплекса, содержащую RS, при этом когда такая композиция расщепляется под действием протеазы, ассоциированной с тканью-мишенью, с высвобождением фрагмента, содержащего связывающие домены первой части, тогда фрагмент расщепленной первой части имеет конечную молекулярную массу, которая по меньшей мере на 20% меньше, или по меньшей мере на 30% меньше, или по меньшей мере на 40% меньше, или по меньшей мере на 50% меньше, или по меньшей мере на 60% меньше, или по меньшей мере на 70% меньше, или по меньшей мере на 80% меньше, чем у интактной композиции химерного полипептидного комплекса, которая не подвергается расщеплению под действием протеазы. В другом воплощении изобретение включает композицию химерного полипептидного комплекса, содержащую RS, при этом когда такая композиция расщепляется под действием протеазы, ассоциированной с тканью-мишенью, с высвобождением фрагмента, содержащего связывающие домены первой части, тогда фрагмент расщепленной первой части имеет конечный гидродинамический радиус, который по меньшей мере на 20% меньше, или по меньшей мере на 30% меньше, или по меньшей мере на 40% меньше, или по меньшей мере на 50% меньше, или по меньшей мере на 60% меньше, или по меньшей мере на 70% меньше, или по меньшей мере на 80% меньше, чем у интактной композиции химерного полипептидного комплекса, которая не подвергается расщеплению под действием протеазы. В частности, предполагается, что в воплощениях заявленных композиций химерного полипептидного комплекса, расщепление под действием ассоциированной с данной тканью протеазы приводит к образованию фрагмента, содержащего связывающие домены первой части, который способен более эффективно проникать в ткань, такую как опухолевая, вследствие уменьшения размера данного фрагмента относительно интактной композиции, что приводит к фармакологическому эффекту, известному в данной области техники для объединенных связывающих доменов в указанной ткани или клетке, который может включать повреждение мембраны, индукцию апоптоза, цитоллиз или гибель клетки-мишени. В частности, также предполагается, что RS в композициях химерного полипептидного комплекса сконструированы для применения в композициях, предназначенных для направленного воздействия на конкретные ткани, содержащие конкретную протеазу, которая, как известно, продуцируется такой тканью-мишенью или клеткой-мишенью. В одном из воплощений RS содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой субстрат для протеазы, ассоциированной с тканью, которая является раковой. В другом воплощении RS содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой субстрат для протеазы, ассоциированной с раковой опухолью. В другом воплощении RS содержит аминокислотную последовательность, пред-

ставляющую собой субстрат для протеазы, ассоциированной с таким видом рака, как лейкоз. В другом воплощении RS содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой субстрат для протеазы, ассоциированной с пролиферативным расстройством. В другом воплощении RS в композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой субстрат для протеазы, ассоциированной с воспалительным заболеванием.

В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат по меньшей мере для одной протеазы, выбранной из группы, состоящей из металлопротеиназ, цистеиновых протеаз, аспартатных протеаз и сериновых протеаз. В другом воплощении RS представляет собой субстрат для одной или более протеаз, выбранных из группы, состоящей из меприна, неприлизина (CD10), PSMA, BMP-1 (костный морфогенетический белок), дизинтегрин A и металлопротеиназ (ADAM), ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17 (TACE (TNF α -превращающий фермент)), ADAM19, ADAM28 (MDC-L (дизинтегрин-металлопротеиназный обогащенный цистеинами белок, экспрессируемый лимфоцитами)), ADAM с тромбоспондиновыми мотивами (ADAMTS), ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, MMP-1 (коллагеназа 1), MMP-2 (желатиназа A), MMP-3 (стромелизин 1), MMP-7 (матрилизин 1), MMP-8 (коллагеназа 2), MMP-9 (желатиназа B), MMP-10 (стромелизин 2), MMP-11 (стромелизин 3), MMP-12 (эластаза макрофагов), MMP-13 (коллагеназа 3), MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-19, MMP-23 (CA-MMP (MMP с цистеиновым массивом)), MMP-24 (MT5-MMP), MMP-26 (матрилизин 2), MMP-27 (CMMP), легумина, катепсина B, катепсина C, катепсина K, катепсина L, катепсина S, катепсина X, катепсина D, катепсина E, секретазы, активатора плазминогена урокиназного типа (uPA) и тканевого типа (tPA), плазмина, тромбина, простатоспецифического антигена (PSA, KLK3 (калликреин 3)), эластазы нейтрофилов человека (HNE), эластазы, триптазы, трансмембранных сериновых протеаз II типа (TTSP), DESC1 (протеаза 1, дифференцированно экспрессируемая при плоскоклеточном раке), гепсина (HPN), матриптазы, матриптазы-2, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 (CAP2), белка активации фибробластов (FAP), родственной калликреинам пептидазы (из семейства KLK), KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13 и KLK14. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для ADAM17. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для BMP-1. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для катепсина. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для цистеиновой протеазы. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для сериновой пептидазы HtrA1. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для легумина. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для MT-SP1 (сериновая протеаза 1 мембранного типа). В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для металлопротеиназы. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для эластазы нейтрофилов. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для тромбина. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для трансмембранной сериновой протеазы II типа (TTSP). В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для TMPRSS3. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для TMPRSS4. В некоторых воплощениях RS представляет собой субстрат для uPA. В одном из воплощений RS в композиции химерного полипептидного комплекса представляет собой субстрат по меньшей мере для двух протеаз, выбранных из группы, состоящей из MMP-2, MMP-9, uPA и матриптазы. В другом воплощении RS в композиции химерного полипептидного комплекса представляет собой субстрат для протеаз MMP-2, MMP-9, uPA и матриптазы.

В одном из воплощений RS в композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой субстрат для внеклеточной протеазы, секретируемой тканью-мишенью, включая, но не ограничиваясь этим, протеазы из табл. 3. В другом воплощении RS в композиции химерного полипептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, представляющую собой субстрат для клеточной протеазы, локализованной внутри клетки, включая, но не ограничиваясь этим, протеазы из табл. 3.

В некоторых воплощениях согласно изобретению предложены RS-содержащие композиции, предназначенные для использования в заявленных композициях химерного полипептидного комплекса, содержащие по меньшей мере первую расщепляемую последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в табл. 4. В некоторых воплощениях последовательность RS в заявленных композициях выбрана из группы последовательностей, состоящей из LSGRSDNHSPLGLAGS, SPLGLAGSLSGRSDNH, SPLGLSGRSDNH, LAGRSDNHSPLGLAGS, LSGRSDNHVPLSLKMG, SPLGLAGS, GPLALARG, LSGRSDNH, VPLSLTMG, VPLSLKMG, VPLSLSMG, EPLELVAG, EPLELRAG, EPAALMAG, EPASLMAG, RIGSLRTA, RIQFLRTA, EPFHLMAG, VPLSLFMG, EPLELPAG и EPLELAAG. Там, где это желательно, последовательность RS в заявленной композиции химерного полипептидного комплекса представляет собой LSGRSDNHSPLGLAGS. В одном из воплощений RS в композиции химерного полипептидного комплекса содержит последовательность BSRS1 (биспецифичную последовательность отделяемого сегмента 1) из табл. 4. В другом воплощении RS в композиции химерного полипептидного комплекса состоит из последовательности BSRS1 из табл. 4.

В другом воплощении RS в расщепляемой конъюгатной композиции содержит первую расщепляемую последовательность и вторую расщепляемую последовательность, отличающуюся от указанной первой расщепляемой последовательности, при этом каждая последовательность выбрана из группы по-

следовательностей, приведенных в табл. 4, и первая и вторая расщепляемые последовательности соединены друг с другом посредством 1-6 аминокислот, выбранных из глицина, серина, аланина и треонина. В другом воплощении RS в расщепляемой конъюгатной композиции содержит первую расщепляемую последовательность, вторую расщепляемую последовательность, отличающуюся от указанной первой расщепляемой последовательности, и третью расщепляемую последовательность, при этом каждая последовательность выбрана из группы последовательностей, приведенных в табл. 4, и первая, и вторая, и третья расщепляемые последовательности соединены друг с другом посредством 1-6 аминокислот, выбранных из глицина, серина, аланина и треонина. В других воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие один, два или три RS. Предполагается, что несколько RS в композициях химерного полипептидного комплекса могут быть объединены в цепочку с образованием универсальной последовательности, которая может расщепляться под действием нескольких протеаз. Подразумевается, что такие композиции будут с большей легкостью расщепляться с участием пораженных заболеванием тканей-мишеней, экспрессирующих несколько протеаз, в результате чего полученные фрагменты, несущие связывающие домены, будут с большей легкостью проникать в ткань-мишень и оказывать фармакологический эффект посредством этих связывающих доменов.

Таблица 3

Протеазы тканей-мишеней

Класс протеаз	Протеаза
Металлопротеиназы	Меприн
	Неприлизин (CD10)
	PSMA
	BMP-1
	Дизинтегрин А и металлопротеиназы (ADAM)
	ADAM8
	ADAM9
	ADAM10
	ADAM12
	ADAM15
	ADAM17 (TACE)
	ADAM19
	ADAM28 (MDC-L)
	ADAM с тромбоспондиновыми мотивами (ADAMTS)
	ADAMTS1
	ADAMTS4
	ADAMTS5
	Матриксные металлопротеиназы (MMP)
	MMP-1 (коллагеназа 1)
	MMP-2 (желатиназа А)
	MMP-3 (стромелизин 1)
	MMP-7 (матрилизин 1)
	MMP-8 (коллагеназа 2)
	MMP-9 (желатиназа В)
	MMP-10 (стромелизин 2)
	MMP-11 (стромелизин 3)
	MMP-12 (эластаза макрофагов)
	MMP-13 (коллагеназа 3)
	MMP-14 (MT1-MMP)
	MMP-15 (MT2-MMP)
	MMP-19
	MMP-23 (CA-MMP)
	MMP-24 (MT5-MMP)
	MMP-26 (матрилизин 2)
	MMP-27 (CMMP)
Цистеиновые протеазы	Легумаин
	Цистеиновые катепсины
	Катепсин В
	Катепсин С
	Катепсин К
	Катепсин L
	Катепсин S
Аспартатные протеазы	Катепсин X
	Катепсин D
	Катепсин E
Сериновые протеазы	Секретаза
	Урокиназа (uPA)
	Активатор плазминогена тканевого типа (tPA)
	Плазмин
	Тромбин
	Простатоспецифический антиген (PSA, KLK3)
	Эластаза нейтрофилов человека (HNE)
	Эластаза
	Триптаза

	Трансмембранные сериновые протеазы II типа (TTSP)
	DESC1
	Гепсин (HPN)
	Матриптаза
	Матриптаза-2
	TMPRSS2
	TMPRSS3
	TMPRSS4 (CAP2)
	Белок активации фибробластов (FAP)
	Родственная калликреинам пептидаза (семейство KLK)
	KLK4
	KLK5
	KLK6
	KLK7
	KLK8
	KLK10
	KLK11
	KLK13
	KLK14

Таблица 4

Последовательности отделяемых сегментов (RS)

Обозначение RS	Протеаза, действующая на последовательность	Типичная расщепляемая последовательность	Расщепляемые последовательности*
BSRS1	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	LSGR↓SDN↓HSPLG↓LAGS	
BSRS2	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	SPLG↓LAGSLSGR↓SDN↓H	
BSRS3	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	SPLG↓LSGR↓SDN↓H	
BSRS4	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	LAGR↓SDN↓HSPLG↓LAGS	
BSRS5	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	LAGR↓SDN↓HVPLS↓LSMG	
BSRS6	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	LAGR↓SDN↓HEPLE↓LVAG	
BSRS7	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	LSGR↓SDN↓HVPLS↓LK↓MG	
RS1	MMP-2, 7, 9, 14	SPLG↓LAGS	
RS2	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза, uPA, легумин	GPLG↓LAR↓G	
RS3	Матриптаза, uPA, легумин	LSGR↓SDN↓H	
RS4	MMP-2, 14	GTAH↓LMGG	
RS5	MMP-14	RIGS↓LRTA	
RS6	MMP-14	RIGA↓LRTA	
RS7	MMP-14	RIGW↓LRTA	
RS8	MMP-14	RIGN↓LRTA	
RS9	MMP-14	RIGF↓LRTA	
RS10	MMP-14	RIFF↓LRTA	
RS11	MMP-14	RILF↓LRTA	
RS12	MMP-14	RIYF↓LRTA	
RS13	MMP-14	RIQF↓LRTA	
RS14	MMP-14	EPAA↓LMAG	
RS15	MMP-14	EPAN↓LMAG	
RS16	MMP-14	EPAS↓LMAG	
RS17	MMP-14	EPFH↓LMAG	
RS18	MMP-14	EPWH↓LMAG	
RS19	MMP-14	EPRH↓LMAG	
RS20	MMP-7	VPLS↓LFMG	
RS21	MMP-7	VPLS↓LHMG	
RS22	MMP-7	VPLS↓LQAG	
RS23	MMP-2, 7, 9, 14	VPLS↓LTMG	
RS24	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза	VPLS↓LKMG	
RS25	MMP-2, 7, 9, 14	VPLS↓LSMG	
RS26	MMP-7	VPLS↓LNAG	
RS27	MMP-7	VPLS↓LLMG	
RS28	MMP-7	EPLE↓LPAG	
RS29	MMP-2, 7, 9, 14	EPLE↓LAAG	
RS30	MMP-2, 7, 9	EPLE↓LVAG	
RS31	MMP-7	EPLE↓LSAG	
RS32	MMP-7	EPLE↓LDAG	
RS33	MMP-7	EPLE↓LQAG	
RS34	MMP-2, 7, 9, 14, матриптаза	EPLE↓LRAG	
RS35	MMP-7	EPLE↓LKAG	
RS36	MMP-2, 7, 9, 14	EPLE↓LIAG	
RS37	Эластаза-2	LGPV↓SGVP	-/-/-VIAT/-/-/-/-
RS38	Гранзим-B	VAGD↓SLEE	V/-/-/D/-/-/-/-/-

RS39	MMP-12	GPAG↓LGGA	G/PA/-/G/L/-/G/-
RS40	MMP-13	GPAG↓LRGA	G/P/-/G/L/-/GA/-
RS41	MMP-17	APLG↓LRLR	-/PS/-/-/LQ/-/LT/-
RS42	MMP-20	PALP↓LVAQ	
RS43	TEV	ENLYFQ↓G	ENLYFQ/GS
RS44	Энтерокиназа	DDDK↓IVGG	
RS45	Протеаза 3C (PreScission™)	LEVLFQ↓GP	
RS46	Сортаза А	LPKT↓GSES	L/P/KEAD/T/G/-/EKS/S
RS47	Трипсин	K↓X** или R↓X	K/X или R/X
RS48	Трипсин	R↓X**	SASRSA
RS49	uPA	SGR↓SA	S/G/R/SRKA/AGSVR
RS50	tPA	YGR↓SA	RYFLI/GA/R/RVAS/AG
RS51	PSA	SSYY↓SG	S/S/FY/Y/S/G
RS52	DESC1	RRAR↓VVG	R/RAL/ALY/R/AV/V/G/G
RS53	Гепсин	RQLR↓VVG	R/RQ/YL/R/V/V/G/G
RS54	Матриптаза-2	RRAR↓VVG	R/R/A/R/AV/V/G/G
RS55	MT-SP1/ матриптаза	RQAR↓VVG	R/QR/A/R/AVY/V/G/G
RS56	PSMA	N↓γ-N	N/γ-N
RS57	Катепсин С	GF↓FY	GP/FWR/X/-
RS58	Катепсин D	F↓IK	FL/IV/KE
RS59	Катепсин E	F↓IK	FL/IV/KE
RS60	Катепсин F	WLR↓	WYRNle/L/RKQ
RS61	Катепсин K	KPR↓	KMGH/ILPNle/RKQ
RS62	Катепсин L	KFR↓	RKLnL/FYW/RKQ
RS63	Катепсин S	RVK↓	RPI/VLMnL/RKQ
RS64	Катепсин V/L2	PWR↓	PNleR/WYF/RKQ
RS65	MMP	PLG↓HofOmL	
RS66	MMP	EPCitF↓HofYL	
RS67	MMP-2	PQG↓IAGQ	
RS68	MMP-2	PQG↓IMelG	
RS69	MMP-9	AALG↓NvaP	
RS70	MMP-9	GPQG↓IAGQR	
RS71	MMP-9	SGKIPRT↓ATA	SGKIP/R/PSTRA/Hy/ST/A
RS72	MMP-9	SGPLF↓YSVTA	
RS73	MMP-9	PLR↓LSW	
RS74	MMP-9	GKGPRQ↓ITA	
RS75	MMP-9	SGRR↓LIHHT	S/G/R/R/L/IL/HHT
RS76	MMP-9	SGQPHY↓LTTA	
RS77	MMP-9	SG↓LKALM	
RS78	MMP-9	SGFGSRY↓LTA	
RS79	MMP-9	SGLRPAK↓STA	
RS80	MMP-9	LGP↓STST	
RS81	MMP-9	PQG↓VR	
RS82	MMP-9	PSG↓LP	P/S/G/L/HyP
RS83	MMP-9	PAG↓VQ	
RS84	MMP-9	PSG↓RD	
RS85	MMP-9	PPG↓IV	P/P/G/G/Hy/HyR
RS86	MMP-9	PEN↓FF	
RS87	MMP-9	PLK↓LM	
RS88	MMP-9	PGA↓YH	
RS89	MMP-9	AIH↓IQ	
RS90	MMP-9	HFF↓KN	
RS91	MMP-9	GLS↓LS	
RS92	MMP-9	ASD↓YK	
RS93	MMP-2, MMP-9	GPLG↓MLSQ	
RS94	MMP-2, MMP-9	CG↓LDD	
RS95	MMP-2, MMP-9, MT1-MMP	GPQG↓IWGQ	
RS96	MMP-7	RPLA↓LWRS	
RS97	MMP-7	GPLG↓LARK	
RS98	Hk2 (гексокиназа 2)	GKAFR↓RL	
RS99	MMP-9, uPA	RPSA↓SRSA	

RS100	MMP-2	PLGLDpaAR	
RS101	MMP-9	PMG↓IST	P/LMVQChaHofNva/G/LIYSF C/ST
RS102	MMP-9	PChaG↓SmcHA	P/LCha/G/LSmc/HW/A
RS103	MMP-13, MMP-8	PChaNvaHADpa	
RS104	ADAM10	PTASA↓LKG	P/T/A/AS/A/LFYQ/KRTI/GA S
RS105	ADAM17	PRPAA↓VKGT	P/HR/P/AS/A/VIL/KRTVI/GS T/TP
RS106	Катепсин В	V↓Cit	
RS107	Катепсин В	F↓K	
RS108	Эластаза	AA↓PV	
RS109	Катепсин D	GPIC↓FRLG	
RS110	Плазмин	A↓FK	
RS111	Легумаин	AAN↓L	
RS112	Легумаин	PTN↓	PTAWS/TPASI/N
RS113	Меприн	↓DGP	ED/GTAV/-
RS114	Меприн А	F↓SPFR	SFAMTY /SFAMTY/P/PVIGA/-
RS115	Меприн В	E↓EEAY	DE/DE/YEFDG/PVIGA/-
RS116	Неприлизин	β-AIA↓L	β-A/LI/A/L
RS117	ADAMTS4	E↓VQRKTGT	E/AFVLMY/(-)/RK/- - (-)/ST
RS118	ADAMTS4	DVQE↓FRGVTAVIR	
RS119	ADAMTS4	HNE↓FRQRETYMVF	
RS120	ADAMTS5	KEEE↓GLGS	
RS121	ADAMTS5	GELE↓GRGT	
RS122	ADAMTS5	NITEGE↓ARGS	
RS123	ADAMTS5	TAQE↓AGEG	
RS124	ADAMTS5	VSQE↓LGQR	
RS125	ADAMTS5	PTAQE↓AGE	

↓ указывает сайт расщепления.

Специальное сокращение для аминокислот: Cit: цитруллин; Cha: β-циклогексилаланин; Hof: гомотенилаланин; Orn: орнитин; Nva: аминосубериновая кислота; Dpa: D-фенилаланин; Nle: норлейцин; Smc: S-метилцистеин; MnL: метилнорлейцин; Mel: мелфалан.

* Перечисление нескольких аминокислот до косой черты, между косыми чертами или после косой черты указывает на альтернативные аминокислоты, которые могут быть заменены в этом положении; "-" указывает на то, что любая аминокислота может быть заменена на соответствующую аминокислоту, указанную в средней колонке.

** х представляет собой любую L-аминокислоту, не являющуюся пролином.

Ну представляет собой любую гидрофобную L-аминокислоту.

γ указывает на то, что связь представляет собой связь через гамма-карбоксыльную группу.

3. Объемная группировка.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к композициям химерного полипептидного комплекса, содержащим по меньшей мере первую объемную группировку. В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие объемную группировку. Неограничивающие примеры объемных группировок включают удлиненный рекомбинантный полипептид (XTEN, описанный в данном изобретении ниже); альбумин-связывающий домен; альбумин; IgG-связывающий домен; полипептиды по меньшей мере из 350 аминокислотных остатков, состоящие из пролина, серина и аланина; жирную кислоту; эластиноподобный белок (ELP) (отдельные субъединичные или строительные блоки ELP происходят из состоящего из пяти аминокислот мотива, обнаруженного в белке эластине человека, который повторяется несколько раз, образуя биополимер ELP, как описано в WO 2016081884), Fc домен, полиэтиленгликоль (ПЭГ), PLGA и гидроксиэтилкрахмал. В другом воплощении объемная группировка содержит две разные объемные группировки, выбранные из группы, состоящей из XTEN; альбумин-связывающего домена; альбумина; IgG-связывающего домена; полипептидов, состоящих из пролина, серина и аланина; жирной кислоты; Fc домена, полиэтиленгликоля (ПЭГ), PLGA и гидроксиэтилкрахмала, причем эти две объемные группировки соединены друг с другом и, в свою очередь, с отделяемым сегментом композиции. В предпочтительном воплощении объемная группировка заявленных композиций представляет собой одну молекулу или несколько молекул XTEN. В другом предпочтительном воплощении композиции химерного полипептид-

ного комплекса содержат объемную группировку с последовательностью, имеющей по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью XTEN сопоставимой длины, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5. В данных воплощениях полипептиды XTEN присоединены рекомбинантным путем к отделяемому(ым) сегменту(ам) (RS) второй части композиций.

Без привязки к теории отметим, что включение объемной группировки в структуру заявленных композиций осуществлено для придания некоторых важных свойств: 1) для получения композиций химерного полипептидного комплекса с объемной группировкой, которая экранирует связывающие домены и уменьшает аффинность связывания с целевыми антигенами и антигенами эффекторных клеток, когда композиция является интактной, 2) для получения композиций химерного полипептидного комплекса с объемной группировкой, которая обеспечивает увеличенный период полувыведения при введении субъекту, 3) для получения композиций химерного полипептидного комплекса с объемной группировкой, которая ослабляет экстравазацию в нормальные ткани и органы, но позволяет до некоторой степени экстравазировать в пораженные заболеванием ткани (например, в опухоль) с большими размерами пор в сосудистой системе, а также может высвобождаться из этой композиции под действием определенных протеаз млекопитающих, что позволяет тем самым связывающим доменам композиции с большей легкостью проникать в пораженные заболеванием ткани и одновременно связываться с целевыми антигенами на эффекторной клетке и опухолевой клетке. Чтобы удовлетворить эти потребности, согласно данному изобретению предложены композиции химерного полипептидного комплекса, присутствие в которых объемной группировки обеспечивает увеличение массы и гидродинамического радиуса полученной композиции. В предпочтительных воплощениях объемная группировка представляет собой полипептид XTEN, присутствие которого предоставляет определенные преимущества в строении заявленных композиций в том плане, что обеспечивает не только увеличение массы и гидродинамического радиуса, но и таких характеристик, как гибкость, неструктурированность, обеспечивает экранирующий эффект в отношении связывающих доменов первой части композиции, снижая тем самым вероятность связывания с антигенами в нормальных тканях или сосудистой системе нормальных тканей, которые не экспрессируют или экспрессируют целевые антигены и/или антигены эффекторных клеток с более низкими уровнями, и улучшает растворимость и надлежащий фолдинг scFv.

(1) XTEN.

В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие одну или более молекул XTEN, введенных рекомбинантным путем в композицию.

Термин "XTEN", использованный в данном описании, относится к полипептидам с неприродными, по существу неповторяющимися последовательностями, характеризующимися низкой степенью вторичной или третичной структуры или их отсутствием в физиологических условиях, а также дополнительными свойствами, описанными в приведенных далее абзацах. Обычно XTEN содержит от по меньшей мере примерно 100 до по меньшей мере примерно 1000 или более аминокислот, и более предпочтительно от по меньшей мере примерно 200 до по меньшей мере примерно 900 аминокислот, и более предпочтительно от по меньшей мере примерно 400 до примерно 866 аминокислот, большинство из которых или все являются небольшими гидрофильными аминокислотами. Исползованный в данном описании термин XTEN специально не включает в себя целые антитела или фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела и Fc-фрагменты). Полипептиды XTEN находят применение в качестве партнеров по слиянию в том плане, что они играют разные роли, придавая определенные желаемые свойства, когда они находятся в составе композиции, содержащей, например, биспецифично связывающие домены первой части заявленных композиций химерного полипептидного комплекса, описанных в данном изобретении. Полученные композиции обладают улучшенными свойствами, такими как улучшенные фармакокинетические, физикохимические, фармакологические и усовершенствованные токсикологические и фармацевтические свойства, по сравнению со случаем, когда соответствующие связывающие домены не присоединены к XTEN, что делает их полезными при лечении определенных состояний, для которых, как известно в данной области, предназначено применение этих связывающих доменов.

Отсутствие структурированности и физико-химические свойства XTEN, помимо всего прочего, вытекают из общего аминокислотного состава, который непропорционально ограничен 4-6 типами гидрофильных аминокислот, присоединением аминокислот в поддающемся количественному определению, по существу неповторяющемся порядке, и из полученной в результате длины и/или конфигурации полипептида XTEN. Предпочтительным признаком, общим для XTEN, но не являющимся общим для нативных полипептидов, является то, что свойства XTEN, изложенные в данном описании, не привязаны к абсолютным первичным аминокислотным последовательностям, о чем свидетельствует разнообразие типичных последовательностей из табл. 5, которые, находясь в разных диапазонах длины, обладают схожими свойствами и придают улучшенные свойства композициям, в составе которых они находятся, и многие из них подробно рассмотрены в разделе Примеры. Действительно, в частности, предполагается, что композиции по изобретению не должны ограничиваться теми XTEN, которые конкретно перечислены в табл. 5, а, скорее всего, воплощения включают последовательности, имеющие по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с последовательностями из табл. 5, поскольку

ку они проявляют описанные ниже свойства XTEN. Установлено, что такие XTEN обладают свойствами, более характерными для небелковых, гидрофильных полимеров (таких как полиэтиленгликоль или "ПЭГ"), чем для белков. XTEN по настоящему изобретению демонстрируют одно или более из следующих предпочтительных свойств: определенную и ровную длину (для заданной последовательности), конформационную гибкость, более низкое содержание вторичной структуры или ее полное отсутствие, высокую степень вероятности образования статистического клубка, высокую степень растворимости в воде, высокую степень устойчивости к протеазам, низкую иммуногенность, слабое связывание с рецепторами млекопитающих, определенную величину заряда и более высокие значения гидродинамических радиусов (или радиусов Стокса); свойства, которые аналогичны свойствам некоторых гидрофильных полимеров (например, полиэтиленгликоля), которые делают их особенно полезными в качестве партнеров по слиянию.

XTEN, как компонент(ы) заявленных слитых белков, сконструированы с возможностью вести себя в физиологических условиях аналогично денатурированным пептидным последовательностям независимо от протяженности длины полимера. Термин "денатурированный" описывает состояние пептида в растворе, которое характеризуется большой конформационной свободой пептидного остова. Большинство пептидов и белков принимают соответствующую денатурированному состоянию конформацию в присутствии высоких концентраций денатурирующих агентов или при повышенной температуре. Пептиды в соответствующей денатурированному состоянию конформации имеют, например, характерные спектры кругового дихроизма (КД) и характеризуются отсутствием взаимодействий дальнего порядка по данным ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Выражения "соответствующая денатурированному состоянию конформация" и "соответствующая неструктурированному состоянию конформация" используются в данном описании как синонимы. В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие последовательности XTEN, которые в физиологических условиях имеют сходство с денатурированными последовательностями, по существу лишенными вторичной структуры в физиологических условиях. Выражение "по существу лишенный", как оно использовано в этом контексте, означает, что по меньшей мере примерно 80%, или примерно 90%, или примерно 95%, или примерно 97%, или по меньшей мере примерно 99% аминокислотных остатков XTEN в последовательности XTEN не вносят вклада во вторичную структуру, по результатам измерений или определений методами, изложенными в данном описании, включая алгоритмы или спектрофотометрические виды анализов.

Для определения и подтверждения физико-химических свойств заявленного XTEN в данной области техники известен целый ряд общепринятых методов и анализов. Такие свойства включают, но не ограничиваются этим, наличие вторичной или третичной структуры, растворимость, агрегацию белка, стабильность, абсолютную и кажущуюся молекулярную массу, чистоту и однородность, связанные с плавлением свойства, содержание примесей и воды. Методы оценки таких свойств включают аналитическое центрифугирование, ЭПР (электронный парамагнитный резонанс), ионообменную HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), сочетание HPLC и гель-проникающей хроматографии (SEC), обращенно-фазовую HPLC, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ионообменную HPLC, гель-проникающую HPLC, инфракрасную (ИК) спектроскопию, ЯМР, спектроскопию комбинационного рассеяния, рефрактометрию и спектроскопию в ультрафиолетовой (УФ)/видимой областях. В частности, вторичная структура может быть оценена спектрофотометрически, например, с использованием спектроскопии кругового дихроизма в "дальней УФ" спектральной области (190-250 нм). Каждый из элементов вторичной структуры, таких как альфа-спираль и бета-лист, равно как и отсутствие этих структурных элементов, обуславливает характерную форму и величину пиков в спектрах КД. Вторичная структура для полипептидной последовательности также может быть предсказана с использованием определенных компьютерных программ или алгоритмов, таких как хорошо известный алгоритм Чоу-Фасмана (Chou P.Y., et al. (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) и алгоритм Гарнье-Осгурта-Робсона ("GOR алгоритм") (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.*, 266: 540-553), которые описаны в публикации заявки на патент США № 20030228309A1. Для заданной последовательности с помощью этих алгоритмов можно предсказать, имеется ли какая-либо вторичная структура или такой нет вообще, и это выражают в виде общего количества и/или процентного содержания остатков в этой последовательности, которые образуют, например, альфа-спирали или бета-листы, или процентного содержания остатков в этой последовательности, которые предсказуемо приводят к образованию статистического клубка (у которого отсутствует вторичная структура). Анализ полипептидных последовательностей можно проводить с помощью алгоритма Чоу-Фасмана, используя сайты всемирной компьютерной сети, например, на fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1, и GOR алгоритма на npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html (оба по состоянию на 5 сентября 2012 г.). Наличие статистического клубка может быть определено различными методами, включая использование измерений характеристической вязкости, которая соизмерима с длиной цепи зависимым от конформации образом (Tanford C., Kawahara K. & Lapanje S. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 1921-1923), а также посредством геле-

проникающей хроматографии (Squire P.G., Calculation of hydrodynamic parameters of random coil polymers from size exclusion chromatography and comparison with parameters by conventional methods. *Journal of Chromatography*, 1981, 5, 433-442). Дополнительные методы описаны в Arnau, et al, *Prot. Expr. and Purif.* (2006), 48, 1-13.

В одном из воплощений, последовательности XTEN в композициях химерного полипептидного комплекса имеют процентное содержание альфа-спиралей в диапазоне от 0% до менее чем примерно 5%, и процентное содержание бета-листов в диапазоне от 0% до менее чем примерно 5%, что определено с использованием алгоритма Чоу-Фасмана, и по меньшей мере примерно на 90% состоят из статистического клубка, что определено с использованием GOR алгоритма. В другом воплощении, последовательности XTEN описанных композиций имеют процентное содержание альфа-спиралей менее чем примерно 2% и процентное содержание бета-листов менее чем примерно 2%, что определено с использованием алгоритма Чоу-Фасмана, и по меньшей мере примерно на 90% состоят из статистического клубка, что определено с использованием GOR алгоритма. В другом воплощении у последовательностей XTEN в таких композициях по существу отсутствует вторичная структура по результатам измерений с использованием кругового дихроизма.

Установлено, что нерегулярность структуры, характерная для XTEN, используемого в заявленных композициях по настоящему изобретению, вместе с аминокислотами конкретных типов, которые преобладают в таком XTEN, в большей степени, чем абсолютная первичная последовательность, определяет одно или более чем одно из улучшенных физико-химических и биологических свойств XTEN и полученных композиций химерного полипептидного комплекса. Соответственно, несмотря на то, что последовательности из табл. 5 являются типичными, они не предназначены для ограничения, поскольку последовательности, имеющие по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательности с последовательностями из табл. 5, демонстрируют улучшенные свойства XTEN. Такие улучшенные свойства включают высокую степень экспрессии композиций химерного полипептидного комплекса в виде слитого белка в клетке-хозяине, более высокую генетическую стабильность гена, кодирующего XTEN, являющийся частью заявленных композиций; XTEN обеспечивает более высокую степень растворимости полученных композиций химерного полипептидного комплекса при менее выраженной тенденции к агрегации и улучшенную фармакокинетику полученных композиций химерного полипептидного комплекса по сравнению со случаем, когда связывающие домены не присоединены к XTEN. Такие улучшенные свойства позволяют более эффективно осуществлять процесс получения, добиться большей однородности конечного продукта, более низкой стоимости изделий и/или обеспечивают разработку технологии приготовления фармацевтических препаратов, содержащих композицию химерного полипептидного комплекса в очень высокой концентрации по белку, в некоторых случаях превышающей 100 мг/мл, а также имеющих улучшенный профиль безопасности и уменьшенный интервал дозирования, который описан более полно ниже, в отношении полученных композиций.

В некоторых воплощениях последовательность XTEN, использованная в композициях химерного полипептидного комплекса по изобретению, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из AE144, AE144_1A, AE144_2A, AE144_2B, AE144_3A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_4B, AE144_5A, AE144_6B, AE288_1, AE288_2, AE144A, AE144B, AE180A, AE216A, AE252A, AE288A, AE324A, AE360A, AE396A, AE432A, AE468A, AE504A, AE540A, AE576A, AE612A, AE648A, AE684A, AE720A, AE756A, AE792A, AE828A, AE869, AE144_R1, AE288_R1, AE432_R1, AE576_R1, AE864_R1, AE712, AE864_R2, AE912, AM923, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A и любой их комбинации. См. US 2010-0239554 A1. В одном из конкретных воплощений XTEN содержит последовательность, выбранную из AE144, AE288, AE576, AE864, AE865 или AE866 или любой их комбинации.

В некоторых воплощениях, в которых меньше 100% аминокислот XTEN в композициях химерного полипептидного комплекса выбраны из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), или в которых меньше 100% последовательности состоит из последовательностей XTEN из табл. 5, остальные аминокислотные остатки в XTEN выбраны из какой-либо из других 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно выбраны из гидрофильных аминокислот, вследствие чего последовательность XTEN содержит по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере примерно 99% гидрофильных аминокислот. Содержание гидрофобных аминокислот в XTEN, используемом в композициях химерного полипептидного комплекса, может представлять собой содержание гидрофобных аминокислот, составляющее меньше 5%, или меньше 2%, или меньше 1%. Гидрофобные остатки, которые являются менее предпочтительными в конструкции XTEN, включают остатки триптофана, фенилаланина, тирозина, лейцина, изолейцина, валина и метионина. Кроме того, последовательности XTEN могут содержать меньше 5%, или меньше 4%, или меньше 3%, или меньше 2%, или меньше 1% следующих аминокислот либо вообще их не содержать: метионина (например, чтобы избежать окисления) или аспарагина и глутамина (чтобы избежать дезамидирования).

Аминокислотные последовательности для некоторых последовательностей XTEN, применяемых в воплощениях химерного полипептидного комплекса по изобретению, показаны в табл. 5.

Полипептиды XTEN

Название XTEN	Аминокислотная последовательность
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP PSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

[illegible]

[illegible]

AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPAT
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPAT
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS

AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEP
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSESAT

AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSES

[illegible]

[illegible]

Данным изобретением рассматриваются композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие XTEN промежуточной длины по отношению к таковым из табл. 5, а также XTEN большей длины, куда добавлены мотивы из 12 аминокислот к N- или С-концу XTEN из табл. 5, введенные в химерный полипептидный комплекс. В одном из воплощений композиция химерного полипептидного ком-

плекса содержит XTEN из табл. 5 с добавлением одной или более копий одного или более мотивов, выбранных из группы мотивов, представленных в табл. 6.

Таблица 6
Последовательности мотивов из 12 аминокислот и семейства мотивов для XTEN

Семейство мотива*	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОТИВА
AD	GESPGGSSGSES
AD	GSEGSSGPGESS
AD	GSSESGSSEGGP
AD	GSGGEPSESGSS
AE	GSPAGSPTSTEE
AE	GSEPATSGSETP
AE	GTSESATPESGP
AE	GTSTEPSEGSAP
AF	GSTSESPSGTAP
AF	GTSTPESGSASP
AF	GTSPSGESSTAP
AF	GSTSSTAESPGP

* Означает отдельные последовательности мотивов, которые при совместном использовании в различных перестановках приводят к образованию "семейной последовательности".

Дополнительные примеры последовательностей XTEN, которые можно использовать согласно настоящему изобретению и которые описаны в публикациях заявок на патент США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1 либо международных публикациях патентных заявок № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2, WO 2014/011819 A2 или WO 2015/023891.

4. Связывающиеся с Т-клетками композиции.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены мономерные слитые белки, содержащие первую часть, вторую часть и третью часть, при этом указанная первая часть содержит последовательности VL и VH связывающего домена антитела к CD3, соединенные гибким линкером; указанная вторая часть содержит первый отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться под действием протеазы млекопитающих; и третья часть содержит первую объемную группировку, содержащую последовательность XTEN, при этом указанная объемная группировка и первые части способны высвободиться из композиции под действием указанной протеазы млекопитающих на указанную вторую часть. В некоторых из указанных выше воплощений, последовательности VL и VH первой части в заявленной композиции происходят из VL и VH моноклонального антитела, выбранных из группы последовательностей, приведенных в табл. 1. Там, где это желательно, VL и VH в заявленных композициях происходят из моноклонального антитела huUCHT1 из табл. 1. В частности, предполагается, что порядок компоновки составляющих частей в композициях может быть разным применительно к порядку расположения от N-конца к С-концу, как показано схематично на фиг. 29. В одном из воплощений композиции сконструированы, в ориентации от N- к С-концу следующим образом: связывающие домены-RS-XTEN, а в другом воплощении данные части сконструированы в следующем порядке: XTEN-RS-связывающие домены.

В некоторых воплощениях связывающихся с Т-клетками композиций связывающие домены антитела к CD3 содержат последовательность VH и VL из табл. 1, RS во второй части выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 4, а XTEN третьей части выбран из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 5.

В других воплощениях изобретения предложены связывающиеся с Т-клетками композиции в виде слитых белков, имеющих по меньшей мере примерно 90% идентичность последовательности или по меньшей мере примерно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность или идентичные на 100% последовательности, в случае оптимального выравнивания, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей, приведенных в табл. 7. В одном из воплощений связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-1 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-2 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-3 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-4 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-5 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-6 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-7 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-8 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную

последовательность TCB-9 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-10 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-11 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-12 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-13 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-14 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-15 из табл. 7. В другом воплощении связывающаяся с Т-клеткой композиция имеет аминокислотную последовательность TCB-16 из табл. 7. В других воплощениях изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие связывающиеся с Т-клетками композиции в виде слитых белков, имеющие по меньшей мере примерно 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере примерно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность или идентичные на 100% последовательности, приведенной в табл. 7, и, возможно, подходящие препараты носителей, стабилизаторов и/или эксципиентов.

Согласно другому аспекту изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим связывающиеся с Т-клетками композиции в виде слитых белков из табл. 7. В одном из воплощений изобретения предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие связывающиеся с Т-клетками композиции в виде слитых белков, при этом полинуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере примерно 90% идентичность последовательности, или по меньшей мере примерно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичность, или идентичны на 100% последовательности, в случае оптимального выравнивания, выбранной из группы, состоящей из полинуклеотидных последовательностей, приведенных в табл. 7, или комплементарных им последовательностей.

Согласно родственному аспекту изобретение относится к способу получения композиций химерного полипептидного комплекса, в котором используется полинуклеотид, кодирующий связывающуюся с Т-клеткой скомпонованную композицию и лигируемый с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей связывающий домен, обладающий аффинностью к антигену клетки-мишени. В одном из воплощений изобретения предложен способ получения композиций химерного полипептидного комплекса, включающий использование полинуклеотида из табл. 7, кодирующего связывающиеся с Т-клетками скомпонованные композиции, с последующим присоединением рекомбинантным путем гена, кодирующего второй связывающий домен и линкер, причем второй связывающий домен обладает специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, при этом полученный ген введен в подходящий экспрессирующий вектор под контролем промотора и линкера; полученный экспрессирующий вектор затем используют для трансформации подходящей клетки-хозяина *E.coli*, которую далее растят в условиях, подходящих для экспрессии химерного полипептидного комплекса в виде слитого белка, который затем выделяют с использованием методов очистки, изложенных в данном описании или известных в данной области техники. В примерах 1 и 2, ниже, приводятся типичные способы осуществления указанного выше способа. В некоторых из указанных выше воплощений второй связывающий домен представляет собой scFv, при этом VH и VL второго связывающего домена выбраны из группы парных последовательностей VH и VL моноклональных антител, приведенных в табл. 2. В указанных выше воплощениях используется преимущество модульной природы генов, кодирующих связывающиеся с Т-клетками композиции, которые легко могут быть использованы вместе с полинуклеотидами, кодирующими разнообразные вторые связывающие домены, описанные в данном изобретении, посредством слияния рекомбинантным путем последовательностей, кодирующих переменную последовательность антитела к CD3, и последовательности, кодирующей второй связывающий домен, с последовательностями, кодирующими связывающуюся с Т-клеткой композицию, что выражается в способности создавать многочисленные индивидуальные гены, которые могут быть использованы для экспрессии желаемого слитого белкового продукта химерного полипептидного комплекса. В частности, предполагается, что применение гена, кодирующего связывающуюся с Т-клеткой композицию, для получения композиций химерного полипептидного комплекса не ограничивается полинуклеотидами, кодирующими композиции химерного полипептидного комплекса, описанные в данном изобретении, но он может быть использован вместе с геном, кодирующим связывающий домен с аффинностью к любой представляющей интерес ткани-мишени или клетке-мишени, которые обладали бы восприимчивостью к цитотоксическим эффектам полученного экспрессированного слитого белка.

Согласно другому аспекту связывающиеся с Т-клетками композиции из табл. 7 полезны в качестве терапевтических иммуносупрессивных агентов при лечении определенных заболеваний или состояний у субъекта, в случае которых, как было продемонстрировано, применение препаратов на основе антител к CD3 приводит к получению клинической пользы, таких как, но не ограничиваясь этим, трансплантация органов и острое отторжение трансплантата, болезнь Крона, язвенный колит и диабет 1 типа, а также для индуцирования иммунной толерантности.

Таблица 7

Связывающиеся с Т-клетками композиции

Название конст-рукции	Аминокислотная последовательность	Последовательность ДНК
TBP-1	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCRASQD IRNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSRLES GVPSTRFSGSGSDT YTLTISSLQPEDFA TYYCQQGNTLPWTF GQGTKVEIKGATPP ETGAETESPGETT GSAESEPPEGEVQ LVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGYSTFG YTMNWVRQAPGKGL EWVALINPYKGVST YNQKFDRFTISVD KSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARSGY YGDSWDYFDVWGQ TILVTVSSGTAEAS ASGLSGRSDNHSPL GLAGSPGSPAGSPT STEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGT GGGCGACCGTGTACCATCACCTGCCGTGCGAGCCCAAGACATCC GTAACCTACCTGAACCTGGTATCAGCAAAAGCCGGGTAAAGCGCCG AAGCTGCTGATCTACTATACCAGCCGCTGAGAGAGCGCGGTGCC GAGCCGTTTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTCCGCGACCTACTATTGC CAGCAGGGTAACACCCTGCCGTGGACCTTTGGTCAAGGCACCAA AGTTGAGATTAAGGCGCCACGCCTCCGGAACCTGGTGCTGAGA CGGAATCCCCTGGTGAAACCACTGGCGGTTCGCGCAATCTGAA CCGCCTGGTGAAAGCGAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGCGG TCTGGTGCAACCAGGCGGTAGCCTGCGCTGAGCTGCGCGGCGGA CGGGTTACAGCTTTACCGGTTATACCATGAACCTGGGTTCGTCAA GCGCCAGGTAAAGGTCTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTA CAAGGGTGTAGCACCTATAACCAGAAGTTCAAAGACCGTTTTTA CCATTAGCGTGGATAAGAGCAAAAACACCGCGTACCTGCAAAATG AACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCGCG TAGCGGTACTATGGCGACAGCGACTGGTATTTTGATGTGTGGG GCCAAGGCACCTGGTTACCGTGAGCTCCGGCACCCCGGAAGCA GCTagcgccctctGGCctgTCAggtCGTtctGATaacCATtccCC ActgGGTctgGCTGGGTCTCCAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCCAA CCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCC GGTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTCTGTCTCCAGG CTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCA CCGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCG TCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGA ATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTC CAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTC CCGCGGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTC GGCCACTCCTGAGTCCCGTCCGGGCACGAGCACCGAGCGAGCG AGGGTTCAGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCGAGGGTACG GCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCTACGTCTACGGAAGAGGG TACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACACGAG CTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTGCG ACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGG CAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCCGAATCTGGCC CGGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACT TCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGA ACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCC CTGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGC GGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGG CACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTTGCTCCGAAC CTGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGAATCTGCG ACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGCTGAGGG TAGCGCACCCAGGTACCGACCTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCAC CGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACC TCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAAGGTACTAGCACGGA ACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGGTACGAGCACCGAACCGTCCG AGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCAC GAAGAAGGCACGAGCACCGAGCCGTCCGAAGGTTCGCGACCAAG TACAAGCGAGAGCGGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGC CTGCAACCGAGGGTCTGAGACCGCGGGCACTCCGAATCTGCG ACCCCGAGTCCGGTCCAGGTTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTC GGAACCGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCGGAGTCTGGTC

	GTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSA PGTS SATP ESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES PGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES PGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGHHHHHH	CGGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACC GGGTACT AGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGCAGG TTCTCCAACCAGCACCAGAAGGTTCCCTGCTGGTAGCCCGA CCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTTGG TACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCTG AGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACT TCTGGCTCTGAGACTCCAGGCCTTCTGAGTCCGCAACGCCTGA ATCCGGTCCGTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCC CAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTCTGGTACT TCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGG TAGCCCGACCAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGC CGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAA ACCCCGGGTACCTCCGAATCTGTACACCGGAAAGCGGTCTTGG CAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGG CAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCCG AGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGA GAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC CAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGC GAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGGTTCCGAACACGC GACCCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGCAGCGCACCCAA CGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCT GCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGG TAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACCGCCGGGTACACGG AAAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCCTAGCACCGAGCCA TCGGAGGGCTCCGCACCAGGTACCATCATCACCATCAC
TBP-2	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITICRASQD IRNYLNWYQQKPGK APKLLIYYTSRLES GVPSPRFSGSGSTD YTLTISSLQPEDFA TYYCQQGNTLPWTF GQGTKEVIKGAATPP ETGAETESPGETTG GSAESEPPEGEVQ LVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGYSTFG YTMNWVRQAPGKGL EWVALINPYKGVST YNQKFKDRFTISVD KSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARSGY YGSDWYFDVWQG TLVTVSSGTAEAAAS ASGLSGRSDNHVPL SLKMGPGSPAGSPT STEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGT GGGCGACCGTGTACCATCACCTGCCGTGCGAGCCAAGACATCC GTAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAAAAGCCGGTAAAGCGCCG AAGCTGCTGATCTACTATACCAGCCGTCTGGAGAGCGCGGTGCC GAGCCGTTTTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACACCCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTCGCGACCTACTATTGC CAGCAGGGTAACACCCCTGCCGTGGACCTTTGGTCAAGGCACCAA AGTTGAGATTAAAGGCGCCACGCCTCCGGAAACTGGTGCTGAGA CGGAATCCCTGGTGAAACCACTGGCGGTTCTGCCGAATCTGAA CCGCCTGGTGAAGGCGAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGCGG TCTGGTGCAACCAGGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGA GCGGTTACAGCTTTACCGGTTATACCATGAACTGGGTTCTGTCAA GCGCCAGGTAAGGTCTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTA CAAGGGTGTAGCACCTATAACCAGAAAGTTCAAAGACCGTTTTTA CCATTAGCGTGGATAAGAGCAAAAACACCGCGTACCTGCAAAATG AACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCGCG TAGCGGTTACTATGGCGACAGCGACTGGTATTTTGATGTGTGGG GCCAAGGCACCCCTGGTTACCGTGAGCTCCGGCACCGCCGAAGCA GCTagcgctctGGCctgTCAggtCGTtctGATAaacCATgttCC ActgTCTctgAAAatgGGTCCAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAA CCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCC GGTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGG CTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCA

GSPAGSPTSTEEGT	CCGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCG
STEPSEGSAPGTST	TCCGAAGGCAGTGTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCCGGA
EPSEGSAPGTSESA	ATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTC
TPESGPGSEPATSG	CAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTCA
SETPGSEPATSGSE	CCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTC
TPGSPAGSPTSTEE	GGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCG
GTSESATPESGPGT	AGGGTTAGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGC
STEPSEGSAPGTST	GCACCGGGTTCTCCGGCGGGTCCCCCTACGTCTACGGAAGAGGG
EPSEGSAPGSPAGS	TACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCGACA
PTSTEEGTSTEPSE	CTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTGCG
GSAPGTSTEPSEGS	ACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGG
APGTSESATPESGP	CAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGGAATCTGGCC
GTSTEPSEGSAPGT	CGGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACT
SESATPESGPGSEP	TCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGA
ATSGSETPGTSTEP	ACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCC
SEGSAAPTSTEPSE	CTGAAAGCGGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGC
GSAPGTSESATPES	GGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGG
PGTSESATPESGP	CACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTTGCTCCGAAC
GSPAGSPTSTEEGT	CTGCTACCTCTGGTTCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCG
SESATPESGPGSEP	ACTCCGGAATCTGGCCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGG
ATSGSETPGTSESA	TAGCGCACCCAGGTACCGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCAC
TPESGPGTSTEPSE	CGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACC
GSAPGTSTEPSEGS	TCCACTGAGCCATCCGAGGGTTACGACCCAGGTACTAGCACGGA
APGTSTEPSEGSAP	ACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGGTACGAGCACCGAACCCTCGG
GTSTEPSEGSAPGT	AGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCGGGCTCTCCGACACGACCC
STEPSEGSAPGTST	GAAGAAGGCACACGACCCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGACACCAGG
EPSEGSAPGSPAGS	TACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTACGGAGC
PTSTEEGTSTEPSE	CTGCAACCAAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACCTCCGAATCTGCG
GSAPGTSESATPES	ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTACAGAGCCGGCGACGAGCGGTTT
PGSEPATSGSETP	GGAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTC
GTSESATPESGPGS	CGGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGGTACT
EPATSGSETPGTSE	AGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCAGG
SATPESGPGTSTEP	TTCTCCAACCAAGCACCGAAGAAGGTTCCCTCTGCTGGTAGCCCGA
SEGSAAPTSESATP	CCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCGCCAACTTCTACT
ESGPGSPAGSPTST	GAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCCGAAGCGGTCTGCTGG
EEGSPAGSPTSTEE	TACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAAGGCACCTTCTG
GSPAGSPTSTEEGT	AGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGGCCAGGTTCTGAACCAAGCAACT
SESATPESGPGTST	TCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCCTGA
EPSEGSAPGTSESA	ATCCGGTCTGTTCTGAACCAAGTACTTCCGGCAGCGAAGCC
TPESGPGSEPATSG	CAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACT
SETPGTSESATPES	TCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAAGTTCTCCGGCTGG
GPSEPATSGSETP	TAGCCCGACCAAGCACGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGC
GTSESATPESGPGT	CGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAA
STEPSEGSAPGSPA	ACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAGCGGTCTGCTGG
GSPTSTEEGTSESA	CAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGG
TPESGPGSEPATSG	CAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCCG
SETPGTSESATPES	AGCGAGGGTAGTGTCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGA
GPSPAGSPTSTEE	GAGCGGTCCAGGCACCAAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC
GSPAGSPTSTEEGT	CAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGC
STEPSEGSAPGTSE	GAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAACCAAGC
SATPESGPGTSESA	GACCAAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCAAGGCAGCCCAA
TPESGPGTSESATP	CGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCT
ESGPGSEPATSGSE	GCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGG

	TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGHHHHHH	TAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAGCG AAAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACCTAGCACCCGAGCCA TCGGAGGGCTCCGCACCAAGGTACCATCATCACCATCAC
TBP-3	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGYS FTGYTMNWVRQAPG KGLEWVALINPYKG VSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR SGYYGDSWDYFDVW QQGLVTVSSGATP PETGAETESPGETT GGSASEPPEGGDI QMTQSPSSLSASVG DRVITITCRASQDIR NYLNWYQQKPKGAP KLLIYYTSRLESGV PSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATY YCQQGNTLPWTFGQ GTKVEIKGTAEAAAS ASGLSGRSDNHSPL GLAGSPGSPAGSPT STEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS	GAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGCGGTCTGGTGCAACCAGG CGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGTTACAGCTTTA CCGGTTATACCATGAACCTGGGTTTCGTCAAGCGCCAGGTAAAGGT CTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTACAAGGGTGTTAGCAC CTATAACCAGAAGTCAAAGACCGTTTTTACCATTAGCGTGGATA AGAGCAAAAACACCGCGTACCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCG GAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCGCGTAGCGGTTACTATGG CGACAGCGACTGGTATTTTGATGTGTGGGGCCAAGGCACCCCTGG TTACCGTGAGCTCCGGCGCCACGCCCTCCGGAAACTGGTGCTGAG ACGGAATCCCCTGGTGAAACCACTGGCGGTTCTGCCGAATCTGA ACCGCCTGGTGAGGCGACATCCAATGACCCAGAGCCCGGAGCA GCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTTACCATCACCTGCCGT GCGAGCCAAGACATCCGTAACTACCTGAACCTGGTATCAGCAAAA GCCGGGTAAAGCGCCGAGCTGCTGATCTACTATACCAAGCCGTC TGGAGAGCGCGTGCCGAGCCGTTTTCAGCGGTAGCGGTAGCGGT ACCGACTACACCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTT CGCGACCTACTATTGCCAGCAGGGTAACACCTGCGGTGAGCCT TTGGTCAAGGCACCAAAGTTGAGATTAAAGGCACCGCCGAAGCA GCTagcgccctctGGCctgTCAGgtCGTtctGATaacCATtccCC ActgGGTctgGCTGGGTCTCCAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAA CCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCC GGTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAAGCGAAGGTTCCTGCTCCAGG CTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCA CCGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCG TCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGA ATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTC CAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTC CCGGCGGGTAGCCCCGACGAGCAGGAGGAAGGTACCTCTGAGTC GGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCG AGGGTTACGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGCTCCGAGGGTAGC GCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCTACGTCTACGGAAGAGGG TACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACACGCA CTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCAGTACGCGAGTCTGCG ACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGG CAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAACTCTGGCC CGGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACT TCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGA ACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCC CTGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGC GGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTCTCCAACTCCACTGAAGAAGG CACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTCTGGCTCCGAAC CTGCTACCTCTGGTTCCGAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCG ACTCCGGAATCTGGCCCCGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGG TAGCGCACCAAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCAC CGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTCTGCGCCGGGTACC TCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAAGGTACTAGCACGGA

	APGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPA GSPTSSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGHHHHH	ACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCGTCGG AGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACC GAAGAAGGCACCGACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAGG TACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGC CTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCG ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTAGAGCCGGCGACGAGCGGTTTC GGAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGAGTCTGGTTC CGGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCCGGTACT AGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCAGG TTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCCTCTGCTGGTAGCCCGA CCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCCTGG TACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACCTCTG AGTCTGCTACTCCAGAAGCGGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACT TCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTCTGAGTCCGCAACGCCCTGA ATCCGGTCTGGTCTGAACAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCC CAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACT TCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGCACACAGGTTCTCCGGCTGG TAGCCCGACCGAGCAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGC CGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAA ACCCCGGGTACTTCCGAATCTGCTACCCGGAAGCGGTCTCTGG CAGCCCTGCTGGTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGG CAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCCG AGCGAGGGTAGTGTCTCCGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGA GAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC CAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGC GAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAACCCAGC GACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCAGGCAGCCCAA CGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCT GCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGG TAGCGAACCTGCGACGTCTGGTCTGAAACGCCGGGTACCAGCG AAAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACCTAGCACCGAGCCA TCGGAGGGCTCCGCACCAGGTACCATCATCACCATCAC
TBP-4	EVQLVESGGGLVQP GGLRLSCAASGYS FTGYTMNWVRQAPG KGLEWVALINPYKG VSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAR SGYYGDSDFWYFDVW GQGLTVTVSSGATP PETGAETESPGETT GGSASEPPPEGDI QMTQSPSSLSASVG DRVITITCRASQDIR NYLNWYQQKPKGKAP KLLIYYTSRLESGV PSRFSGSGSGTDYTT	GAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGCGGTCTGGTGCAACCAGG CGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCAGCGGTTACAGCTTTA CCGGTTATACCATGAAGTGGGTTCTGTCAGCGCCAGGTAAGGT CTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTACAAGGGTGTTAGCAC CTATAACCAGAAGTTCAAAGACCGTTTTTACCATTAGCGTGGATA AGAGCAAAAACACCGCGTACCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCG GAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCGGTAGCGGTTACTATGG CGACAGCGACTGGTATTTTGTGTGTGGGGCCAAGGCACCCCTGG TTACCGTGAGCTCCGGCGCCACGCCTCCGGAACCTGGTGTGAG ACGGAATCCCTGGTGAAACCACTGGCGGTTCTGCCGAATCTGA ACCGCCTGGTGAAGGCGACATCCAAATGACCCAGAGCCCGAGCA GCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTTACCATCACCTGCCGT GCGAGCCAAGACATCCGTAACTACCTGAACTGGTATCAGCAAAA GCCGGGTAAAGCGCCGAGCTGCTGATCTACTATACCAGCCGTC TGGAGAGCGCGGTGCCGAGCCGTTTACGCGGTAGCGGTAGCGGT ACCGACTACCCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGAAGATTT

LTISLQPEDFATY	CGCGACCTACTATTGCCAGCAGGGTAACACCCCTGCCGTGGACCT
YCQGNLTPWTFGQ	TTGGTCAAGGCACCAAAGTTGAGATTAAGGCACCGCCGAAGCA
GTKVEIKGTAEAAAS	GCTagcgccctctGGCctgTCAggtCGTtctGATaacCATggttcc
ASGLSGRSDNHVPL	ActgTCTctgAAAatgGGTCCAGGTAGCCACAGCTGGTAGCCCAA
SLKMGPSPAGSPT	CCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCC
STEEGTSESATPES	GGTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGG
GPSTSTEPSEGSAP	CTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCAGTAGCA
GSPAGSPTSTEEGT	CCGAACCATCTGAGGGTTCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCG
STEPSEGSAPGTST	TCCGAAGGCAGTGTCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGA
EPSEGSAPGTSESA	ATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTC
TPESGPGSEPATSG	CAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTCA
SETPGSEPATSGSE	CCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTC
TPGSPAGSPTSTEE	GGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCG
GTSESATPESGPST	AGGGTTTCAGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGC
STEPSEGSAPGTST	GCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCTACGTCTACGGAAGAGGG
EPSEGSAPGSPAGS	TACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCCAGCA
PTSTEEGTSTEPSE	CTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTGCG
GSAPGTSTEPSEGS	ACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGG
APGTSESATPESGP	CAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAATCTGGCC
GTSTEPSEGSAPGT	CGGGTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACT
SESATPESGPGSEP	TCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGA
ATSGSETPGTSTEP	ACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCC
SEGSAPGTSTEPSE	CTGAAAGCGGCCCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGC
GSAPGTSESATPES	GGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGG
GPSTSESATPESGP	CACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAAC
GSPAGSPTSTEEGT	CTGCTACCTCTGGTTCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCG
SESATPESGPGSEP	ACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGG
ATSGSETPGTSESA	TAGCGCACCCAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCAC
TPESGPGTSTEPSE	CGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACC
GSAPGTSTEPSEGS	TCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCCAGGTACTAGCACGGA
APGTSTEPSEGSAP	ACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCCGAACCGTCGG
GTSTEPSEGSAPGT	AGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCC
STEPSEGSAPGTST	GAAGAAGGCACACGACCCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGACCCAGG
EPSEGSAPGSPAGS	TACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGC
PTSTEEGTSTEPSE	CTGCAACCCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGGG
GSAPGTSESATPES	ACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTT
GPGSEPATSGSETP	GGAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGGGAGTCTGGTC
GTSESATPESGPGS	CGGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGTTCCGGCACCCGGGTACT
EPATSGSETPGTSE	AGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCAGG
SATPESGPGTSTEP	TTCTCCAACCAGCACCGAAGAGGTTCCCTGCTGGTAGCCCGA
SEGSAPGTSESATP	CCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACT
ESGPGSPAGSPTST	GAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCCTGG
EEGSPAGSPTSTEE	TACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAAGGCACTTCTG
GSPAGSPTSTEEGT	AGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAAGCAACT
SESATPESGPGTST	TCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCCTGA
EPSEGSAPGTSESA	ATCCGGTCCCTGGTTCTGAACCAAGTACTTCCGGCAGCGAAACCC
TPESGPGSEPATSG	CAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACT
SETPGTSESATPES	TCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGG
GPGSEPATSGSETP	TAGCCCGACCAAGCACGGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGC
GTSESATPESGPGT	CGGAATCGGGCCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGCTCTGGCAGCGAA
STEPSEGSAPGSPA	ACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCCTGG
GSPTSTEEGTSESA	CAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGG
TPESGPGSEPATSG	CAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCCG

	SETPGTSESATPES PGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGHHHHHH	AGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGA GAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC CAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGC GAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAACCCAGC GACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCAGGCAGCCCAA CGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAAACCGAGCGAGGGTTCT GCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGG TAGCGAACCTGCGACGTCTGGTCTGAAACGCCGGGTACCAGCG AAAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACCTAGCACCGAGCCA TCGAGGGCTCCGCACCAGGTCACCATCATCACCATCAC
TBP-5	ELVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKP QAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGLLG GKAAALTLGVQPED EAEYYCALWYNLW VFGGKTCLTVLGAT PPETGAETESPGET TGGSAESEPPGEGE VQLESGGGLVQPG GSKLSCAASGFTF NTYAMNWRQAPGK GLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQM >NNLKTEDTAVYYCV RHGNFNGSYVSWFA YWQGTLTVVSSGT AEAASASGLSGRSD NHSPLGLAGSPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTS	GAACTGGTCGTACGCGAGGAGCCGTCCCTTACCGTTTCACCAGG TGGAACAGTGACTCTGACGTGTGCTCCTCCACTGGGGGGGTTA CAACTTCCAATTATGCTAATTGGGTCCAGCAGAAGCCGGGCCAA GCCCCTCGCGGGTTGATTGGCGGCACCAACAAACGTGCTCCAGG GACACCTGCCCGTTTTTCGGGCTCCTTATTGGGGGCAAGAGCTG CACTGACGTGTCTGGAGTTCAGCCGGAGGATGAGGCAGAGTAT TACTGCGCATTTGTGGTATTCTAATTATGGGTTTTTGGAGGCGG CACAAAGCTGACCGTCCCTGggtgagaccccgccggaacccggtg cggaaaccgaaagcccgggtgaaaccacgggtggcagcgcgagag agcgaaaccgcccgggtgaaggtGAGGTTCAAGTTGTTGGAAAGCGG GGGCGGGCTTGTCCAACCTGGAGGTTCATTAAATGAGCTGTG CAGCCTCCGATTACCTTTAACACGTATGCAATGAACAGGGTGC CGTCAAGCGCCCGGTAAGGGGCTGGAGTGGGTAGCTCGCATCCG CTCGAAGTATAATAATTACGCAACCTACTACGCAGACAGTGTCA AAGATCGCTTCACTATCTCACGCGACGACAGTAAGAACACGGCC TACTTACAGATGAACAATCTTAAACGGAGGACACCGCTGTCTA CTACTGCGTGCGCCACGGGAATTTCCGTAACCTTTATGTAAGTT GGTTCGCATATTGGGGACAAGGTACGTTGGTAACCGTATCCAGC GGCACCGCCGAAGCAGCTagcgccctctGGCctgTCAggtCGTtc tGATaacCATtcccCActgGGTctgGCTGGGTCTCCAGGTAGCC CAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAGGTACCTCTGAATCC GCTACTCCAGAATCCGGTCCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGA AGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCG AAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAGGGTTCGGCTCCTGGC ACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGA AAGCGCAACTCCGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTT CCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTCTGGTTCT GAAACTCCAGGTTACCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACCGGAGGA AGGTACCTCTGAGTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGA GCACCGAGCCGAGCGAGGGTTACGCCCCGGGTACCAGCACGGAG CCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCCAC GTCTACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCG CGCCAGGCACCCAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACTGGC ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCAC GGAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTA CCCCAGAATCTGGCCCGGGTTCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCT GAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCC TGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGT CTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCAGGCACTCTGAAAGC

	TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGHHHHH	GCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAAC CTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTG GTCTTGGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCCGAACTCCAGGT ACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCAGCAGCAC GGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACTGAGCCTT CTGAGGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGT TCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACC AGGTACTAGCACGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGA GCACCGAACCGTCGGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCCAGCGGC TCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCCGA AGGTTCCGCACCAGGTACAAGCGAGAGCGGACTCCTGAATCTG GTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAGCGGTCTGAGAGCGCCGGGC ACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCCAGAGCC GGCGACGAGCGGTTCCGAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCA CGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGT TCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAGCGGTCC GGGCAGCCCGGAGGTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCC CTGCTGGTAGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTCGAGGT TCCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCC AGAAAGCGGTCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTG CACCAGGCACCTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAGCGCCAGGT TCTGAACCAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTCTGA GTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAACCAGCTACTT CCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAG TCTGGTCTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGCGCACC AGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACAGCAGCAGGAGGAGGTACGT CTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGGCTGCA ACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGTACCTCCGAATCTGCTACACC GGAAAGCGGTCTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCC AGGAGGGTTACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGT ACTAGCACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGA GAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCA CCCTGAGAGCGGCCAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAA TCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCC TGGTTCTGGAACCGAGCGACAGCGGTCTGAAACTCCGGGTAGCC CGGCAGGCAGCCCAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAA CCGAGCGAGGGTTCTGCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGA GGGCTCTGCACCTGGTAGCGAACCAGCGACGTCTGGTTCTGAAA CGCCGGGTACCAGCGAAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGC ACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGCACCAGGTACCATCA TCACCATCAC
TBP-6	ELVVTQEPSTLVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGVPQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGAT PPETGAETESPGET	GAAGTGGTCGTACGCGAGGAGCCGTCCCTTACCGTTTCACCAGG TGGAACAGTGACTCTGACGTGTGCTCCTCCACTGGGGCGGTTA CAACTTCCAATTATGCTAATTGGGTCCAGCAGAAGCCGGGCCAA GCCCCCTCGCGGGTTGATTGGCGGCACCAACAAACGTGCTCCAGG GACACCTGCCCGTTTTTCGGGCTCCTTATGGGGGGCAAAGCTG CACTGACGTTGTCTGGAGTTCAGCCGAGGATGAGGCAGAGTAT TACTGCGCATTGTGGTATTCTAATTTATGGGTTTTTGGAGGCGG CACAAAGCTGACCGTCTTGggtgcgaccccgccgaaaccggtg cggaaccgaaagcccggtgaaaccaccggtggcgagcgcgag

TGGSASEEPPGEGE	agcgaacgcgcccgggtgaaggtGAGGTTCAgTTGTTGGAAAGCGG
VQLESGGGLVQPG	GGCGGGCTTGTCACCTGGAGGTTCAATAAAATTGAGCTGTG
GSLKLSCAASGTF	CAGCCTCCGGATTACCTTTAACACGTATGCAATGAACGGGTG
NTYAMNWVRQAPGK	CGTCAAGCGCCCGGTAGGGGCTGGAGTGGGTAGCTCGCATCCG
GLEWVARIRSKYNN	CTCGAAGTATAATAATTACGCAACCTACTACGCAGACAGTGTCA
YATYYADSVKDRFT	AAGATCGCTTCACATATCTACGCGACGACAGTAAGAACACGGCC
ISRDDSKNTAYLQM	TACTTACAGATGAACAATCTTAAACCGGAGGACACCGCTGTCTA
NNLKTEDTAVYYCV	CTACTGCGTGCGCCACGGGAATTTCCGTAACCTCTATGTAAGTT
RHGNFGNSYVSWFA	GGTTCGCATATTGGGGACAAGGTACGTTGGTAACCGTATCCAGC
YWQGQTLVTVSSGT	GGCACCGCCGAAGCAGCTagcgcctctGGCctgTCaggtCGTtc
AEAASASGLSGRSD	tGATaacCATgttCCActgTCTctgAAAatgGGTCCAGGTAGCC
NHVPLSLKMGPGSP	CAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCC
AGSPTSTEEGTSES	GCTACTCCAGAATCCGGTCTCTGGTACTAGCACTGAGCCAGCGA
ATPESGPGTSTEPS	AGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCG
EGSAPGSPAGSPTS	AAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGC
TEEGTSTEPSEGS	ACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGA
PGTSTEPSEGSAPG	AAGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTT
TSESATPESGPGSE	CCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCACTTCTGGTTCT
PATSGSETPGSEPA	GAAACTCCAGGTTACCGGGCGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGA
TSGSETPGSPAGSP	AGGTACCTCTGAGTCGGCCACTCTGAGTCCGGTCCGGGCACGA
TSSEGTSESATPE	GCACCGAGCCGAGCGAGGGTTACGCCCGGGTACCAGCACGGAG
SGPGTSTEPSEGS	CCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCCTAC
PGTSTEPSEGSAPG	GTCTACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCG
SPAGSPTSTEEGTS	CGCCAGGCACCAAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACTTGGC
TEPSEGSAPGTSTE	ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCAC
PSEGSAPGTSESAT	GGAAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTA
PESGPGTSTEPSEG	CCCCAGAATCTGGCCCGGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCT
SAPGTSESATPESG	GAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCC
PGSEPATSGSETPG	TGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGT
TSTEPSEGSAPGTS	CTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGC
TEPSEGSAPGTSES	GCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAAC
ATPESGPGTSESAT	CTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTG
PESGPGSPAGSPTS	GTCTTGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGT
TEEGTSESATPESG	ACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCAC
PGSEPATSGSETPG	GGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAAGGTACCAGCACTGAGCCTT
TSESATPESGPGTS	CTGAGGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGT
TEPSEGSAPGTSTE	TCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTACGACC
PSEGSAPGTSTEPS	AGGTACTAGCACGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGTACGA
EGSAPGTSTEPSEG	GCACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCGGGC
SAPGTSTEPSEGS	TCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAAGCACCGAGCCGTCCGA
PGTSTEPSEGSAPG	AGGTTCCGCACCAAGGTACAAGCGAGAGCGCACTCTGAATCTG
SPAGSPTSTEEGTS	GTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAAGCGGTTCTGAGACGCCGGGC
TEPSEGSAPGTSES	ACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTACAGAGCC
ATPESGPGSEPAT	GGCGACGAGCGGTTCCGAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCA
GSETPGTSESATPE	CGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGT
SGPGSEPATSGSET	TCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCC
PGTSESATPESGPG	GGGCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACCAAGCACCGAAGAGGTTCCC
TSTEPSEGSAPGTS	CTGCTGGTAGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGT
ESATPESGPGSPAG	TCCCCAATTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCC
SPTSTEEGSPAGSP	AGAAAGCGGTCCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTG
TSTEEGSPAGSPTS	CACCAAGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGT
TEEGTSESATPESG	TCTGAACCAAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTCTGA
PGTSTEPSEGSAPG	GTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAACCAAGTACTT

	TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGHHHHH	CCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAG TCTGGTCTTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACC AGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACAGCACGAGGAGGGGTACGT CTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCA ACGTCTGGCAGCGAAACCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACC GGAAAGCGGTCTTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCAAACCTCTACCG AGGAGGGTTCACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGT ACTAGCACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGA GAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCA CCCTTGAGAGCGGCCAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCTGAA TCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCC TGGTTCGGAACCGAGCGACCAGCGGTCTGAAACTCCGGGTAGCC CGGCAGGCAGCCCAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAA CCGAGCGAGGGTTCTGCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGA GGGCTCTGCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGCTCTGGTTCTGAAA CGCCGGGTACCAGCGAAAGCGCTACCCCGAATCCGGTCCGGGC ACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGTCCGCACCAGGTACCATCA TCACCATCAC
TBP-7	EVQLLESGGGLVQP GGSLKLSCAASGFT ENTYAMNWRQAPG KLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYC VRHGNFNGNSYVSWF AYWQGGLVTVSSG ATPPETGAETESPG ETTGGSASEPPGE GELVVTQEPSTLVS PGGTVTTLTCSRSTG AVTTSNYANWVQK PGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSL GGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYNL WVFGGGLKTLVLGT AEAASASGLSGRSD NHSPGLAGSPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG	GAGGTTCAAGTTGTTGGAAAGCGGGGCGGGCTTGTCCAACCTGG AGGTTTCATTAAAAATTGAGCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTA ACACGTATGCAATGAACGAGGTCCGTCAAGCGCCCGGTAAGGGG CTGGAGTGGGTAGCTCGCATCCGCTCGAAGTATAATAATTACGC AACCTACTACGCAGACAGTGTCAAAGATCGCTTCACTATCTCAC GCGACGACAGTAAGAACACGGCCTACTTACAGATGAACAATCTT AAAACGGAGGACACCGCTGTCTACTACTGCGTGCGCCACGGGAA TTTCGGTAACTCTTATGTAAGTTGGTTGCGATATTGGGGACAAAG GTACGTTGGTAACCGTATCCAGCggtgagaccccgccgaaacc ggtgaggaaaccgaaagcccggtgaaaccacccggtggcagcgc ggagagcgaaaccgcccgggtgaaggtGAACGTGGTCGTCACGCAGG AGCCGTCCCTTACCCTTACCAGGTGGAACAGTGACTCTGACG TGTCGCTCCTCCACTGGGGCGGTTACAACTTCCAATTATGCTAA TTGGGTCCAGCAGAAGCCGGGCCAAGCCCTCGCGGGTTGATTG GCGGCACCAACAAACGTGCTCCAGGGACACCTGCCCGTTTTTCG GGCTCCTTATTGGGGGGCAAAGCTGCACTGACGTTGTCTGGAGT TCAGCCGGAGGATGAGGCAGAGTATTACTGCGCATTTGTGGTATT CTAATTTATGGGTTTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGACCCGCTCTG GGCACCGCCGAAGCAGCTagcgctctctGGCctgTCAGgtCGTtc tGATaacCATtcccActgGGTctgGCTGGGTCTCCAGGTAGCC CAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCC GCTACTCCAGAATCCGGTCTTGGTACTAGCACTGAGCCAAAGCGA AGGTTCTGCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCG AAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCTCTGGC ACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGA AAGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTT CCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCT GAAACTCCAGGTTACCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGA AGGTACCTCTGAGTCGGCCACTCTGAGTCCGGTCCGGGCACGA GCACCGAGCCGAGCGAGGGTTACGCCCCGGGTACACGACGGGAG CCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCTTAC GTCTACGGAAGAGGTACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCG

	SPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSE SAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGHHHHH	CGCCAGGCACCAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGC ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCAC GGAAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTA CCCCAGAACTCTGGCCCGGGTTCGAGGCCAGCTACCTCTGGTTCT GAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCC TGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGT CTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGC GCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAAC CTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTG GTCTGGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGT ACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCAGCAGCAC GGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACTGAGCCTT CTGAGGGCTCTGCAACCGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGT TCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACC AGGTACTAGCACGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCAACAGGTACGA GCACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCACGCGGGC TCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCCGA AGGTTCCGACACAGGTACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTG GTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCGAGCGGTCTGAGACGCGGGC ACTTCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCCAGGCC GCGCAGCGAGCGGTTCGGAACCGCGGGTACGTCTGAATGAGCCA CGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGT TCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCC GGGCAGCCCCGCGAGGTTCTCCAACCGACCGAAGAGGTTCCC CTGCTGGTAGCCCCACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGT TCCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGTACCCC AGAAAGCGGTCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTG CACCAGGCACCTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAGCGGCCAGGT TCTGAACCAAGCACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTCTGA GTCCGCAACCGCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAACCAAGTACTT CCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAG TCTGGTCCCTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGCGACC AGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACCAAGCAGCAGGAGGAGGTACGT CTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCA ACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACC GGAAAGCGGTCTCTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCG AGGAGGGTTACCCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGT ACTAGCACGAGCCGAGCGAGGGTAGTGTCTCCGGGTACGAGCGA GAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCA CCCCTGAGAGCGGCCAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAA TCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCC TGGTTCCGAACCGAGCGACCAGCGGTCTGAAACTCCGGGTAGCC CGGCAGGCAGCCCAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAA CCGAGCGAGGGTTCTGCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGA GGGCTCTGCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAA CGCCGGGTACCAGCGAAAGCGCTACCCAGAATCCGGTCCGGGC ACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGACCAAGGTACCATCA TCACCATCAC
TBP-8	EVQLLESGLVQP GGSILKLSAASGFT	GAGGTTCAAGTTGTTGGAAAGCGGGGCGGGCTTGTCACCTGG AGGTTCAATTAATAATGAGCTGTGAGCCTCCGGATTCACTTTA

FNTYAMNWVRQAPG	ACACGTATGCAATGAACTGGGTCCGTCAAGCGCCCGGTAAGGGG
KGLEWVARIRSKYN	CTGGAGTGGGTAGCTCGCATCCGCTCGAAGTATAATAATTACGC
NYATYYADSVKDRF	AACCTACTACGCAGACAGTGTCAAAGATCGCTTCACTATCTCAC
TISRDDSKNTAYLQ	GCGACGACAGTAAGAACACGGCCTACTTACAGATGAACAATCTT
MNNLKTEDTAVYYC	AAAACGGAGGACACCGCTGTCTACTACTGCGTGCGCCACGGGAA
VRHGNFGNSYVSF	TTTCGGTAACTCTTATGTAAGTTGGTTCGCATATTGGGGACAAG
AYWGGGTLLVTVSSG	GTACGTGGTAACCGTATCCAGCggtgcgaccccccggaacc
ATPPETGAETESPG	ggtgcggaaccgaaagccccgggtgaaaccaccggtggcagcgc
ETTGGSAESEPPGE	ggagagcgaaaccgccccgggtgaaggtGAACTGGTCGTACGCAGG
GELVVTQEPSLTVS	AGCCGTCCCTTACCGTTTACCAGGTGGAACAGTGACTCTGACG
PGGTVTLTCSRSTG	TGTCGCTCCTCCACTGGGGCGGTTACAACCTCCAATTATGCTAA
AVTTSNYANWVQK	TTGGGTCCAGCAGAAGCCGGGCCAAGCCCTCGCGGGTTGATTG
PGQAPRGLIGGTNK	GCGGCACCAACAAACGTGCTCCAGGGACACCTGCCCGTTTTTCG
RAPGTPARFSGSLL	GGCTCCTTATTGGGGGGCAAAGCTGCACTGACGTTGTCTGGAGT
GGKAALTLSGVQPE	TCAGCCGGAGGATGAGGCAGAGTATTACTGCGCATTTGGGTATT
DEAEYYCALWYSNL	CTAATTATGGGTTTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGACCGTCCTG
WVFGGGTKLTVLGT	GGCACCGCCGAAGCAGCTagcgccctctGGCctgtCAggtCGTtc
AEASASGLSGRSD	tGATaacCATgttCCActgtCTctgAAAatgGGTCCAGGTAGCC
NHVPLSLKMGPGSP	CAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAGGTACCTCTGAATCC
AGSPTSTEEGTSSES	GCTACTCCAGAATCCGGTCTCGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGA
ATPESGPGTSTEPS	AGGTTCTGCTCCAGGCTCCCGGCCAGGTAGCCCTACCTTACCG
EGSAPGSPAGSPTS	AAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAGGGTTCGGCTCCTGGC
TEEGTSTEPSEGS	ACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCAGTGTCCGGGTACTTCCGA
PGTSTEPSEGSAPG	AAGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCGAGCCTGGTACTT
TSESATPESGPGSE	CCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCT
PATSGSETPGSEPA	GAAACTCCAGGTTACCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGA
TSGETPGSPAGSP	AGGTACCTCTGAGTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGA
TSTEEGTSESATPE	GCACCGAGCCGAGCGAGGGTTACGCCCCGGGTACCAAGCACGGAG
SGPGTSTEPSEGS	CCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCCCTAC
PGTSTEPSEGSAPG	GCTACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCG
SPAGSPTSTEEGTS	CGCCAGGCACCAAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGC
TEPSEGSAPGTSTE	ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACAGACAC
PSEGSAPGTSESAT	GGAAACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTA
PESGPGTSTEPSEG	CCCCAGAATCTGGCCCGGGTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCT
SAPGTSESATPESG	GAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCC
PGSEPATSGSETPG	TGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCGCTCCTGGTACGT
TSTEPSEGSAPGTS	CTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCCAGGCACCTCTGAAAGC
TEPSEGSAPGTSES	GCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAAC
ATPESGPGTSESAT	CTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTG
PESGPGSPAGSPTS	GTCTGGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCGAAACTCCAGGT
TEEGTSESATPESG	ACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCAC
PGSEPATSGSETPG	GGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAAGGTACCAAGCACTGAGCCTT
TSESATPESGPGTS	CTGAGGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGT
TEPSEGSAPGTSTE	TCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAAGCAC
PSEGSAPGTSTEPS	AGGTACTAGCACGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGGTACGA
EGSAPGTSTEPSEG	GCACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCAGCGGGC
SAPGTSTEPSEGS	TCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAAGCACCGAGCCGTCCGA
PGTSTEPSEGSAPG	AGGTTCCGCACCAAGGTACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTG
SPAGSPTSTEEGTS	GTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAAGCGGTCTGAGACGCCGGGC
TEPSEGSAPGTSES	ACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCAAGGCC
ATPESGPGSEPAT	GGCGACGAGCGGTTCCGAAACGCCGGGTACGCTGAATCAGCCA
GSETPGTSESATPE	CGCCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGT
SGPGSEPATSGSET	TCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCC

	PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATs GSETPGTSESATPE SGPSTSTEPSEGSA PGSPAGSPSTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATs GSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGHHHHHH	GGGCAGCCCGGCAGGTTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCC CTGCTGGTAGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGT TCCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCC AGAAAGCGGTCTCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTG CACCAGGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGT TCTGAACCAAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTCTGA GTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCTTGGTCTGAACCAGCTACTT CCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAG TCTGGTCTTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTCCGCAACC AGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACAGCACGGAGGAGGGTACGT CTGAATCTGCAACGCCGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCA ACGTCTGGCAGCGAAACCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACC GGAAAGCGGTCTTGGCAGCCCTGCTGGTCTCTCAACCTCTACCG AGGAGGGTTACCCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGT ACTAGCACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGA GAGCGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCGCAATCGGCCA CCCCTGAGAGCGGCCAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAA TCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCC TGGTTTCGGAACCGAGCACGCGGTCTGAAACTCCGGGTAGCC CGGCAGGCAGCCCCAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAA CCGAGCGAGGGTTCTGCCCGGGTACTTCCACCGAACCTCGGA GGGCTCTGCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGCTCTGGTTCTGAAA CGCCGGGTACCAGCGAAGCGCTACCCCGAATCCGGTCCGGGC ACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGTCCGCACCAGGTACCATCA TCACCATCAC
TBP-9	HHHHHHGGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPSTSTEPSEGSA PGSPAGSPSTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTS ATPESGPGSEPATs ETPGSPAGSPSTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPSTSESATPESG PGSPAGSPSTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS	CATCACCAACCATCATCACgGAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCCG GTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTTAC CGGCGGGTAGCCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA GGGTTCAGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCG CACCGGGTTCTCCGGCGGGTCCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGT ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCAAGCAC TGAACCGAGCGAAGGCAGCGACCTGGCACTAGCGAGTCTGCGA CTCCGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGC AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCCGAATCTGGCCC GGGTTCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA CCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCC TGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCG GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTTGGTCCGGAACC TGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCCGAATCTGCGA CTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGGT AGCGCACCAAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC

EGSAPGTSTEPSEG	GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCT
SAPGTSTEPSEGS	CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAGGTTACTAGCACGGAA
PGTSTEPSEGSAPG	CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCGTCGGA
TSTEPSEGSAPGTS	GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAAGCACCG
TEPSEGSAPGSPAG	AAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAGGT
SPTSTEEGTSTEPS	ACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC
EGSAPGTSESATPE	TGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGA
SGPGSEPATSGSET	CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTACAGACCGGCGACGAGCGGTTCCG
PGTSESATPESGPG	GAAACGCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCGGAGTCTGGTCC
SEPATSGSETPGTS	GGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGTTCCGACACCGGTTACTA
ESATPESGPGTSTE	GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCGAGCCCGGCAGGT
PSEGSAPGTSESAT	TCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCCTTGCTGGTAGCCCCGAC
PESGPGSPAGSPTS	CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACTG
TEEGSPAGSPTSTE	AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTCTGGT
EGSPAGSPTSTEEG	ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCTGA
TSEATPESGPGTS	GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTT
TEPSEGSAPGTSES	CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACCGCTGAA
ATPESGPGSEPAT	TCCGGTCTCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGCAGCGCAACCC
GSETPGTSESATPE	AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTCTGTTACTT
SGPGSEPATSGSET	CCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGGT
PGTSESATPESGPG	AGCCCCAGCACGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACCGCC
TSTEPSEGSAPGSP	GGATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCACGCTCTGCGACGGAAA
AGSPTSTEEGTSES	CCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTCTGGC
ATPESGPGSEPAT	AGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTTACCCGGC
GSETPGTSESATPE	AGGTAGCCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCAGCGAGCCGA
SGPGSPAGSPTSTE	GCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAG
EGSPAGSPTSTEEG	AGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC
TSTEPSEGSAPGTS	AGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCG
ESATPESGPGTSES	AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGGTTCGGAACCGAGCG
ATPESGPGTSESAT	ACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCGAGGAGCCAAAC
PESGPGSEPATSGS	GAGCACCGAAGAGGTTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTG
ETPGSEPATSGSET	CCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT
PGSPAGSPTSTEEG	AGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCGGGTACCAGCGA
TSTEPSEGSAPGTS	AAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCAT
TEPSEGSAPGSEPA	CGGAGGGCTCCGCACCActgTCAggtCGTtctGATAacCATtcc
TSGETPGTSESAT	CCActgGGTctgGCTGGGTCTGGCACCGCCGAAGCAGCTagcgc
PESGPGTSTEPSEG	ctctGGCGACATCCAAATGACCCAATCACCGTCAATCCCTGAGCG
SAPLSGRSDNHSP	CCTCTGTGGAGATCGTGAACAATTACCTGCCGCGCCTCCCAA
GLAGSGTAEEASAS	GACATCCGCAATTACTTAAACTGGTATCAGCAAAAACCCGGTAA
GDIQMTQSPSSLSA	GGCACCGAAATTGCTGATTTATTATACTTACGCTTAGAGAGTG
SVGDRVITICRASQ	GGGTGCCGTCGCGCTTCAGTGGCTCGGGTAGTGGGACCGATTAC
DIRNYLNWYQKPG	ACATTGACAATTTCACTACTGCAGCCAGAGGATTTTGCGACTTA
KAPKLLIYYTSRLE	TTACTGTCAACAGGGTAACACGCTTCCCTGGACCTTCGGGCAAG
SGVPSRFSGSGSGT	GCACGAAAGTTGAGATCAAGGGCGCTACTCCCCCTGAGACAGGA
DYTLTISSLQPEDF	GCGGAAACGGAATCCCCTGCGGAGACGACGGGTGGTTCCGAGA
ATYYCQQGNTLPWT	GTGGAACCTCCTGGTGGGGCGAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCG
FGQGTKEIKGATP	GTGGCGGTCTGGTGCAACCAGGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGC
PETGAETESPGETT	GCGGCGAGCGGTTACAGCTTTACCGGTTATACCATGAACCTGGGT
GGSAESEPPGEGEV	TCGTCAAGCGCCAGGTAAGGTCTGGAGTGGGTGGCGTGATCA
QLVESGGGLVQPGG	ACCCGTACAAGGGTGTTAGCACCTATAACCAGAAGTTCAAAGAC
SLRLSCAASGYST	CGTTTTACCATTAGCGTGGATAAGAGCAAAAACACCGCGTACCT
GYTMNWVRQAPGKG	GCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCTGTGTACTATT
LEWVALINPYKGV	GCGCGCTAGCGGTTACTATGGCGACAGCGACTGGTATTTTGAT

	TYNQKFKDRFTISV DKSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARSG YYGDSDWYFDVWGQ GTLVTVSS	GTGTGGGGCCAAGGCACCCCTGGTTACCGTGAGCTCC
TBP-10	HHHHHHGGSAPGSP TSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSES	CATCACCACCATCATCACgAGGTAGCCCAGCTGGTAGCCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAAATCCG GTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCGGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTTAC CGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA GGGTTACGCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCGAGGGTAGCG CACCGGGTCTCCGGCGGGTCCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGT ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCGACAC TGAACCGAGCGAAGGCAGCGACCTGGGCACTAGCGAGTCTGCGA CTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGC AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAAATCTGGGCC GGGTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA CCATCCGAAGGTTCGGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCC TGAAGCGGCCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCTCTGAGAGCG GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACTCCACTGAAGAAGGC ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACC TGCTACCTCTGGTTCCGAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGA CTCCGGAATCTGGGCCGGGCACGAGCACGGAGCCGCTCTGAGGGT AGCGCACCAAGGTACCGACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCT CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCTAGCACAGGTTACTAGCACGGAA CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGGTACGAGCACCGAACCGTCGGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCG AAGAAGGCACCGACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGACCAAGGT ACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC TGCAACCGAGCGGTCTGAGACGCGCGGCACTTCCGAATCTGCGA CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCTAGAGCCGGGCACGAGCGGTTCTG GAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCGGAGTCTGGTCC GGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGGTACTA GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGCAGGT TCTCCAACCGAGCACCGAAGAGGTTCCCTGCTGGTAGCCCGAC CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTGGT ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAAGGCACTTCTGA GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCGCAACTT CTGGCTCTGAGACTCCAGGCCTTCTGAGTCCGCAACCGCTGAA TCCGGTCTGGTTCTGAACAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCCC AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACTT CCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAAGGTTCTCCGGCTGGT AGCCCGACCGACGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACCGCC GGAATCGGGCCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGCTTGGCAGCGAAA CCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAGCGGTCTGGC

TBP-11	ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPGSAGPTSTTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPLSGRSDNHVPL SLKMGGTAAEASAS GDIQMTQSPSSLASA SVGDRVTITCRASQ DIRNYLNWQQKPG KAPKLLIYYTSRIE SGVPSRFSGSGSGT DYLTLISSLPEDF ATYYCQQGNTLPWT FQGQTKVEIKGATP PETGAETSPGETT GSAESEPPGGEV QLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGYST GYTMNVWRQAPGKG LEWVALINPYKGV TYNQKFKDRFTISV DKSKNTAYLQMN SLRAEDTAVVYCAR SGYYGDSWYFDVW GQGLTLVTVSS	AGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGG AGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCAGCCGCGCA GCGAGGTTAGTGTCTCGGGTACGAGCAGGACGCAACGCCAGAG AGCGGTTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC AGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCTGAATCCGGCCCTGGTAGCG AGCCCGCAACCTCCGGCTCAGAACTCTGGTTCTGCAACCCAGCG ACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCAGGCAGCCCAAC GAGCACCGAAGAGGGTACCAGCAGCGAACCGGAGCGAGGTTCTG CCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGCTTGCACCTGGT AGCGAACCTGCGACGCTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACACGCG AAGCGCTACCCAGAATCCGGTCCGGGCATAGCACCAGGCATC CGAGGGCTCCGCAACCActTCAggtCGTtctGATaacTAAcTgt CCActgTCTctgAAAtggtGGCACCGCGAAGCAGCTagcgc ctctGGCGACATCCAATGACCCAATCACGCTCATCCCTGAGCG CCTCTGTGGTAGACTGTGTAAACAATTACCTGCCCGCCTCCCAA GACATCCCGCAATTACTTAACTGGTATCAGCAAAAACCCGGTAA GGCACCGAAATTGCTGATTATTATCTTACGCTTAGAGAGTG GGGTGCCGTCGCGCTTCAGTGGCTCGGGTAGTGGGACCGATTAC ACATTGACAATTCATCACTGACGCCAAGAGGATTTTGCGACTTA TTACTGTCAACAGGGTAACACGCTTCCTTGACCTTCGGGCAAG GCACGAAAGTTGAGATCAAGGGCGCTACTCCCCCTGAGACAGGA GCGGAAACCGGAATCCCTGGCGAGACGAGGTTGGTCCGCAGA GTCGGAACCTCCTGGTGAGGGCAGGTGCGAGCTGGTTGAAAGCG GTGGCGGCTCTGGTGCAACACAGCGGTAGCCTCGCTGTAGCTCG CGCGGAGCGGCTTACAGCTTTACCGGTTATACCATGAACGGGT TCGTCGAAGCGCCAGGTAAAGGCTCTGGAGTGGGTGGCGCTGATCA ACCCGTTACAAGGTTGTAGCACCTATAAACCAAGAGTTCAAAGAC CGCTTTTACCAATTAGCTGGATAAAGAGCAAAAACCCGCTACTCT GCAAATGAACAGCGTTCGCTGCGGAGGACACCGCTGTGTACTATT GCGCGCGTAGCGGTTACTATTCGGCGACAGCAGCTGGTATTTGTAT GTGTGGGGCGCAAGCGACCTGGTTACGCTGAGCTTC
	HHHHHHGGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSSES ATPESGPGSEPAT GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTE	CATCACCACTATCATACGgAGGTAGCCAGCTGGTAGGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACTCTGAATCCGTACTCTCAGAATCCG GTCTTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTCTCTGCTCCAGGC TCCCGCGCAGGTAGCCCTACTCTACCGAAGAGGGCATAGCAC GCAACCATTCTGAGGGTTCCGCTCTGCGCACTTCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCAGCAGCTGTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTTAC CGCGCGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCTTGAGTCCGGTCCGGGCAGCAGACCGGACCGGAGCGA GGGTTACGCCCCGGGTACAGCACGGAGCGCTCCGAGGTTAGCG CACCGGGTTCTCCGGGGGCTCCCTTACGTCACGGAAGAGGGT ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACACGAC TGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACTGGCATAGCGAGTCTGCGA CTCCGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACGGAAGCGAGGC AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTTCAACCGAATCTGGCCC GGGTTCCGAGGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCCGAGTACT CCACTGAAACAGCGAAGGTAGCGCTCTGGACTTCTACTGAA

PSEGSAPGTSTEPS	CCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCC
EGSAPGTSESATPE	TGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCG
SGPGTSESATPESG	GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC
PGSPAGSPTSTEEG	ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTCGGCTCCGAACC
TSESATPESGPGSE	TGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGA
PATSGSETPGTSES	CTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCAGGAGCCGCTCTGAGGGT
ATPESGPGTSTEPS	AGCGCACCAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC
EGSAPGTSTEPSEG	GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCT
SAPGTSTEPSEGS	CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCACGGAA
PGTSTEPSEGSAPG	CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCAGAACCGTCCGA
TSTEPSEGSAPGTS	GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCG
TEPSEGSAPGSPAG	AAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAGGT
SPTSTEEGTSTEPS	ACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC
EGSAPGTSESATPE	TGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGA
SGPGSEPATSGSET	CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTTCG
PGTSESATPESGPG	GAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTCC
SEPATSGSETPGTS	GGGTACCTCGACCAGCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGGTACTA
ESATPESGPGTSTE	CGGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCGGGGCAGCCCGCAGGT
PSEGSAPGTSESAT	TCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCCTTGCTGGTAGCCCGAC
PESGPGSPAGSPTS	CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCCACTTCTACTG
TEEGSPAGSPTSTE	AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTTCTGGT
EGSPAGSPTSTEEG	ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCTGA
TSESATPESGPGTS	GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTT
TEPSEGSAPGTSES	CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTTCTGAGTCCGCAACCGCTGAA
ATPESGPGSEPATSG	TCCGGTCTGGTTCTGAACCAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCCC
GSETPGTSESATPE	AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTCTGTACTT
SGPGSEPATSGSET	CCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGCGACCAAGGTTCTCCGGCTGGT
PGTSESATPESGPG	AGCCCGACCAGCACGGAGGAGGGTACGCTGAATCTGCAACGCC
TSTEPSEGSAPGSP	GGAAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCACAGTCTGGCAGCGAAA
AGSPTSTEEGTSES	CCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTTCTGGC
ATPESGPGSEPATSG	AGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGGC
GSETPGTSESATPE	AGGTAGCCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCAGCGAGCCGA
SGPGSPAGSPTSTE	GCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAG
EGSPAGSPTSTEEG	AGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGGCC
TSTEPSEGSAPGTS	AGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGGG
ESATPESGPGTSES	AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCGGAACCAAGCG
ATPESGPGTSESAT	ACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCAGGCAGCCCAAC
PESGPGSEPATSGS	GAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTG
ETPGSEPATSGSET	CCCCGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT
PGSPAGSPTSTEEG	AGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAGCGA
TSTEPSEGSAPGTS	AAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCAT
TEPSEGSAPGSEPA	CGGAGGGCTCCGCACCActgTCaggtCGTtctGATaaccATtcc
TSGETPGTSESAT	CCActgGGTctgGCTGGGTCTGGCACCCGCCGAGCAGCTagcgc
PESGPGTSTEPSEG	ctctGGCGAGGTGCGAGTGGTTGAAAGCGGTGGCGGTCTGGTGC
SAPLSGRSDNHSPL	AACCAGGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGTTAC
GLAGSGTAEASAS	AGCTTTACCGGTTATACCATGAACTGGGTTTCGTCAAGCGCCAGG
GEVQLVESGGGLVQ	TAAAGGTCTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTACAAGGGTG
PGGSLRLSCAASGY	TTAGCACCTATAACCAGAAGTTCAAAGACCGTTTTTACCATTAGC
SFTGYTMNWVRQAP	GTGGATAAGAGCAAAAACACCGCGTACCTGCAAAATGAACAGCCT
GKLEWVALINPYK	GCGTGCGGAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCGCGTAGCGGTT
GVSTYNQFKDRFT	ACTATGCGCAGCAGCACTGGTATTTTGATGTGTGGGGCCAAGGC
ISVDKSKNTAYLQM	ACCCTGGTTACCGTGAGCTCCGGCGCTACTCCCCCTGAGACAGG
NSLRAEDTAVYYCA	AGCGGAACGGAATCCCTGGCGAGACGACGGGTGGTTCCGCAG

	RSGYYGSDWYFDV WQGTGLTVVSSGAT PPETGAETESPGET TGGSAESEPPEGED IQMTQSPSSLASV GDRVTITCRASQDI RNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLESG VPSRFSGSGSGTDY TLTISSLQPEDFAT YYCQQGNLTPWTFG QGTKVEIK	AGTCGGAACTCCTGGTGAGGGCGACATCCAAATGACCCAATCA CCGTCATCCCTGAGCGCCTCTGTTGGAGATCGTGTAAACAATTAC CTGCCGCGCCTCCCAAGACATCCGCAATTACTTAAACTGGTATC AGCAAAAACCCGGTAAGGCACCGAAATTGCTGATTATTATATACT TCACGCTTAGAGAGTGGGGTGCCGTCGCGCTTCAGTGGCTCGGG TAGTGGGACCGATTACACATTGACAATTTCATCACTGCAGCCAG AGGATTTTGCGACTATTACTGTCAACAGGGTAACACGCTTCCC TGGACCTTCGGGCAAGGCACGAAAGTTGAGATCAAG
TBP-12	HHHHHHGGSPAGSP TSTEETSESATPE SGPSTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTS ATPESGPSEPATS GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEETSTEPS EGSAPGSTSTEPSEG SAPGSTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTE PSEGSAPGSTEPS EGSAPGSTSESATPE SGPSTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPSTSTEPS EGSAPGSTSTEPSEG SAPGSTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEETSTEPS EGSAPGSTSESATPE SGPSEPATSGSET PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPSTSTE PSEGSAPGSTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTS	CATCACCACCATCATCAGgAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCCG GTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTCTGCTCCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTAC CGCGGGTAGCCCCGACGAGCACGGAGGAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA GGGTTCAGCCCCGGGTACGAGCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCG CACCGGGTTCTCCGGCGGGTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGT ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCCAGGCACCGAGCAC TGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTGCCA CTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGC AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAACTCTGGCCC GGGTTCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA CCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCC TGAAGCGGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCG GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTTGGCTCCGAACC TGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCCGGAATCTGCCA CTCCGGAATCTGGCCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGGT AGCGCACCGGTACCGAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCT CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAAGGTACTAGCACGGAA CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCCTCGGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCG AAGAAGGCACCGACCGAGCCGTCCGAGGTTCCGCACCAAGGT ACAAGCGAGAGCGGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC TGCAACCGAGCGGTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCCA CCCCAGGTCCGGTCCAGGTTAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCG GAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGGAGTCTGGTCC GGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGTTCCGACCCGGGTACTA GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCAGGT TCTCCAACCGACCGAAGAAGGTTCCCTGTGCTGAGCCCCGAC CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTGGT ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCGAGCACTTCTGA GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCGCAACTT

	TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT SGPSEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPSPAGSPTSTE EGSFAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEG PESGPGTSGAPGTS TEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPLSGRSDNHVPL SLKMGTAEEAAS GEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAP YKGLEWVALINPYK GVSTYNQKFKDRFT ISVDKSNNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCA RSGYYGDSWDYFDV WGQGTLLVTVSSGAT PPETGAETESPGET TGGSAESEPPGEGD IQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQDI RNYLNWYQQKPKGA PKLLIYYTSRLESG VPSRFSGSGSGTDY TLTISSLQPEDFAT YYCQQGNLTPWTFG QGTKVEIK	CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTTCTGAGTCCGCAACGCCTGAA TCCGGTCTCGGTTCTGAACACGCTACTTCCGGCAGCGAAACCCC AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACTT CCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGGT AGCCCGACACGACGAGGAGGGTACGCTCTGAATCTGCAACGCC GGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTTCTGGCAGCGAAA CCCCAGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTGGC AGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGGC AGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGGAGCCGA GCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAG AGCGGTCCAGGCACACGCAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC AGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCTGGTAGCG AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGGTTCGGAACCGAGCG ACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGACGAGCCCAAC GAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTG CCCCAGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT AGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAGCGA AAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCAT CGGAGGGCTCCGCACCACTgTCAGgtCGTtctGATaaccATgtt CCActgTCTctgAAAatgGGTGGCACCCGCCGAAGCAGCTagcgc ctctGGCGAGGTGACGCTGGTTGAAAGCGGTGGCGGTCTGGTG AACCGAGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGTAC AGCTTTACCGGTTATACCATGAACGGGTTCGTCAGCGCCAGG TAAAGGTCTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTACAAGGGTG TTAGCACCTATAACCGAAGTCAAAGACCGTTTTACCATTAGC GTGGATAAGAGCAAAAACACCGCTACCTGCAATGAACAGCCT GCGTCCGGAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCGCTAGCGGTT ACTATGGCGACAGCGACTGGTATTTGATGTGTGGGGCCAAAGC ACCCTGGTTACCGTGAGCTCCGGCGCTACTCCCCCTGAGACAGG AGCGGAAACGGAATCCCTGGCGAGACGACGGGTGGTTCCGCGAG AGTCGGAACCTCCTGGTGAGGGCGACATCAAATGACCAATCA CCGTCATCCCTGAGCGCCTCTGTTGGAGATCGTGTAACAATTAC CTGCGCGCCTCCCAAGACATCCGCAATTACTTAACTGGTATC AGCAAAAACCCGGTAAGGCACCGAAATTGCTGATTTATTATACT TCACGCTTAGAGAGTGGGGTCCCGTCGCGCTTCAGTGGCTCGGG TAGTGGGACCGATTACACATTGACAATTTCATCACTGCAGCCAG AGGATTTTGGGACTTATTACTGTCAACAGGGTAACACGCTTCCC TGGACCTTCGGGCAAGGCACGAAAGTTGAGATCAAG
TBP-13	HHHHHHGGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPSTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS	CATCACCAACCATCATCACggAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCCG GTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTTAC CGGCGGGTAGCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA GGGTTACGCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCG

TEPSEGSAPGSPAG	CACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCTACGTCTACGGAAGAGGGT
SPTSTEEGTSTEPS	ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGGCCAGGCACACAGCAC
EGSAPGTSTEPSE	TGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTGCGA
SAPGTSESATPESG	CTCCGGAGAGCGGTCCCGGTACGAGCAGCGAACCAAGCGAAGGC
PGTSTEPSEGSAPG	AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAAATCTGGCCC
TSESATPESGPGSE	GGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT
PATSGSETPGTSTE	CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA
PSEGSAPGTSTEPS	CCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCC
EGSAPGTSESATPE	TGAAAGCGGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCG
SGPGTSESATPESG	GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC
PGSPAGSPTSTEEG	ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACC
TSESATPESGPGSE	TGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGA
PATSGSETPGTSES	CTCCGGAATCTGGCCCGGGCAGGACGAGCAGGCGCTCTGAGGGT
ATPESGPGTSTEPS	AGCGCACCAAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC
EGSAPGTSTEPSE	GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCT
SAPGTSTEPSEGS	CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCCAGCACCAGGTACTAGCACGGAA
PGTSTEPSEGSAPG	CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCCTCGGA
TSTEPSEGSAPGTS	GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAAGCACC
TEPSEGSAPGSPAG	AAGAAGGCACCAAGCAGGAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAAGGT
SPTSTEEGTSTEPS	ACAAGCGAGAGCGGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC
EGSAPGTSESATPE	TGCAACCAAGCGGTTCTGAGACGCGGGCACTTCCGAATCTGCGA
SGPGSEPATSGSET	CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCCAGAGCCGGCAGCAGCGGTTCCG
PGTSESATPESGPG	GAAACGCCCGGTACGTCTGAATCAGCCAGCCCGGAGTCTGGTCC
SEPATSGSETPGTS	GGGTACCTCGACCGAACCAGCGAAGGTTCCGACCCGGGTACTA
ESATPESGPGTSTE	GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCAGGT
PSEGSAPGTSESAT	TCTCCAACCAAGCAGCAGGAGGTTCCCTGCTGGTAGCCCGAC
PESGPGSPAGSPTS	CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAAGGTTCCCAACTTCTACTG
TEEGSPAGSPTSTE	AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTGGT
EGSPAGSPTSTEEG	ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACCTCTGA
TSESATPESGPGTS	GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAAGCAACT
TEPSEGSAPGTSES	CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTTCTGAGTCCGCAACCGCTGAA
ATPESGPGSEPAT	TCCGGTCTGGTCTGTAACAGCTACTTCCGGCAGCGAAACCCC
GSETPGTSESATPE	AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACTT
SGPGSEPATSGSET	CCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAAGGTTCTCCGGCTGGT
PGTSESATPESGPG	AGCCCCGACCAAGCAGGAGGGGTACGTCTGAATCTGCAACGCC
TSTEPSEGSAPGSP	GGAATCGGGCCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAAA
AGSPTSTEEGTSES	CCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTGGC
ATPESGPGSEPAT	AGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTCCACCGGC
GSETPGTSESATPE	AGGTAGCCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGAGCCGA
SGPGSPAGSPTSTE	GCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAG
EGSPAGSPTSTEEG	AGCGGTCCAGGCACCAAGCAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC
TSTEPSEGSAPGTS	AGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCG
ESATPESGPGTSES	AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAAACTCCTGGTTCCGAACCAAGCG
ATPESGPGTSESAT	ACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCAGGCAGCCCAAC
PESGPGSEPATSGS	GAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTG
ETPGSEPATSGSET	CCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT
PGSPAGSPTSTEEG	AGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAGCGA
TSTEPSEGSAPGTS	AAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCAT
TEPSEGSAPGSEPA	CGGAGGGCTCCGCACCACTgTCAggtCGTtctGATaacCATtcc
TSGETPGTSESAT	CCActgGGTctgGCTGGGTCTGGCACCGCCGAAGCAGCTagcg
PESGPGTSTEPSEG	ctctGGGCAACTGGTCTGTCACGCAGGAGCCGTCCTTACCGTTT
SAPLSGRSDNHSP	CACCAAGGTGAACAGTGACTCTGACGTGTGCTCCTCCACTGGG
GLAGSGTAEASAS	CGGTTACAACCTCCAATTATGCTAATTGGGTCCAGCAGAAGCC

	GELVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCRSSTG AVTTSNYANWVQK PGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGA TPPETGAETESPGE TTGGSASEPPGEG EVQLLESGGGLVQP GGSCLKSCAASGFT ENTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS	GGGCAAGCCCTCGCGGGTTGATTGGCGGCACCAACAAACGTG CTCCAGGGACACCTGCCCGTTTTCGGGCTCCTTATTGGGGGGC AAAGCTGCACTGACGTTGTCTGGAGTTCAGCCGGAGGATGAGGC AGAGTATTACTGCGCATGTGGTATTCTAATTTATGGGTTTTTG GAGGCGGCACAAAGCTGACCGTCTCGggtgaccccgccggaa accggtgcggaaccgaaagcccggtgaaaccaccggtggcag cgcgagagcgaaaccgcggtgaaggtGAGGTTCAAGTTGTTGG AAAGCGGGGCGGGCTTGTCCAACCTGGAGGTTCAATAAAATTG AGCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAACACGTATGCAATGAA CTGGGTCCGTCAAGCGCCCGGTAAGGGCTGGAGTGGGTAGCTC GCATCCGCTCGAAGTATAATAATTACGCAACCTACTACGCAGAC AGTGTCAAAGATCGCTTCACTATCTCACGCGACGACAGTAAGAA CACGGCCTACTTACAGATGAACAATCTTAAACGGAGGACACCG CTGTCTACTACTGCGTGCGCCACGGGAATTTTCGGTAACTCTTAT GTAAGTTGGTTCGCATATTGGGGACAAGGTACGTTGGTAACCGT ATCCAGC
TBP-14	HHHHHHGGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPG	CATCACCACCATCATCACgAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGATCCG GTCTGTGTA TAGCACTGAGCCAAGCGAGGTTCTGCTCCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTTAC CGCGGGTAGCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA GGGTTACGCCCCGGGTACAGCACGGAGCGCTCCGAGGGTAGCG CACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGT ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGCCAGGCACCGAGC TGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGCACTAGCGAGTCTGCCA CTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGC AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAACTCTGGCCC GGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA CCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCC TGAAAGCGGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCTGAGAGCG GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACC TGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCCA CTCCGGAATCTGGCCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGCTCTGAGGGT AGCGCACCAAGGTACAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCT CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAAGGTACTAGCACGGAA CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGGTACGAGCACCGAACCGTCCGA GGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCG AAGAAGGCACACGACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGACACAGGT ACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC TGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCCA CCCCGAGTCCGGTCCAGGTTACAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCCG GAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGAGTCTGGTCC

	SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPSESEPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPE SGPSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPLSGRSDNHVPL SLKMGGTAEASAS GELVVTQEPSLTVS PGGTVTLTCRSTG AVTTSNYANWVQK PGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLL GGKAALTLGSGVQE DEAEYYCALWYSLN WVFGGGTKLTVLGA TTPETGAETESPE TTGGSASEPPGEG EVQLLESGGGLVQP GGSLLKLSAASGFT FNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYC VRHGNFNGNSYVSWF AYWQGQTLVTVSS	GGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGGTACTA GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGCAGGT TCTCCAACCGACACCGAAGAAGGTTCCCTGCTGGTAGCCCGAC CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTGGT ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCGAGGCACCTTCTGA GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCGAGCAACTT CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCCTGAA TCCGGTCTCGGTTCTGAACCACTACTTCCGGCAGCGAAACCCC AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTCTGGTACTT CCACTGAGCCTAGCGAGGTTCCGCACCAAGTTCTCCGGCTGGT AGCCCCAGCGACGAGGAGGAGGTACGCTCTGAATCTGCAACGCC GGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCACAGTCTGGCAGCGAAA CCCCCGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTCGGC AGCCCTGCTGGTTCTCAACCTCTACCGAGGAGGTTTACCCGGC AGGTAGCCCCACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCAGCGAGCCGA GCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAG AGCGGTCCAGGCACGAGCAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC AGGTACTTCTGAGAGCGCACTCTGAATCCGGCCCTGGTAGCG AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGGTTCGGAACCGAGCG ACCAGCGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGAGGAGCGCAAC GAGCACCGAAGAGGTTACAGCACGGAACCGAGCGAGGTTCTG CCCCCGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGTCTGCACCTGGT AGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCGGGTACCAGCGA AAGCGCTACCCAGAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCAT CGGAGGGCTCCGCACCACTgTCAggtCGTtctGATaaccATgtt CCActgTCTctgAAAatgGGTGGCACCGCCGAGCAGCTagcgc ctctGGCGAACTGGTCTGTCACGCAAGGAGCCGTCCCTTACCGTTT CACCAAGTGGAACTGAGTCTGACGTGTCTGCTCCCTCCACTGGG GCGGTACAACTTCCAATTATGCTAATTGGGTCCAGCAGAACCC GGGCCAAGCCCCCTCGCGGGTTGATTGGCGGCACCAACAAACGTG CTCCAGGGACACCTGCCCGTTTTTCGGGCTCCTTATTGGGGGGC AAAGCTGCACTGACGTTGTCTGGAGTTACGCCGAGGATGAGGC AGAGTATTACTGCGCATTGTGGTATTCTAATTTATGGGTTTTTG GAGGCGGCACAAAGCTGACCGTCTCTGggtgcaaccccgccgaa accggtgccgaaaccgaaagcccggtgaaaccaccggtggcag cgcggagagcgaaaccgccccggtgaaggtGAGGTTGAGTTGTTGG AAAGCGGGGGCGGGCTTGTCCAACCTGGAGGTTTATTAATTTG AGCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAACACGTATGCAATGAA CTGGGTCCGTCAAGCGCCCGTAAGGGGTGAGTGGGTAGCTC GCATCCGCTCGAAGTATAATAATTACGCAACCTACTACGCAGAC AGTGTCAAAGATCGCTTCACTATCTCACGCGACGACAGTAAGAA CACGGCCTACTTACAGATGAACAATCTTAAACGGAGGACACCG CTGTCTACTACTGCGTGCGCCACGGGAATTTCCGGTAACCTTAT GTAAGTTGGTTCGCATATTGGGGACAAGGTACGTTGGTAACCGT ATCCAGC
TBP-15	HHHHHHGGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG	CATCACCAACCATCATCACgGAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCCG GTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC

TSTEPSEGSAPGTS	CGAACCATCTGAGGGTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT
TEPSEGSAPGTSSES	CCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA
ATPESGPGSEPATSS	TCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC
GSETPGSEPATSSGS	AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTAC
ETPGSPAGSPTSTE	CGCGGGTAGCCCCAGCAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG
EGTSESATPESGPG	GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA
TSTEPSEGSAPGTS	GGGTTACGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCGCGAGGGTAGCG
TEPSEGSAPGSPAG	CACCGGGTTCTCCGGCGGGCTCCCCACGTCTACGGAAGAGGGT
SPTSTEETSTEPS	ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGGCCAGGCACCGACAC
EGSAPGTSTEPSEG	TGAACCGAGCGAAGGCAGCGACCTGGCACTAGCGAGTCTGCGA
SAPGTSESATPESG	CTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGC
PGTSTEPSEGSAPG	AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAACTCTGGCCC
TSESATPESGPGSE	GGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT
PATSGSETPGTSTE	CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA
PESGAPGTSTEPS	CCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGCTGAAAGCGCTACCCC
EGSAPGTSESATPE	TGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCTGAGAGCG
SGPGTSESATPESG	GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC
PGSPAGSPTSTE	ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAAAC
TSESATPESGPGSE	TGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGA
PATSGSETPGTSES	CTCCGGAATCTGGCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGCTCTGAGGGT
ATPESGPGTSTEPS	AGCGCACAGGTACCGAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC
EGSAPGTSTEPSEG	GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCTCGCGCGGTACTT
SAPGTSTEPSEGS	CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACAGGTACTAGCACGGAA
SPTSTEETSTEPS	CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCTCGGA
EGSAPGTSTEPSEG	GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAAGCACC
TEPSEGSAPGSPAG	AAGAAGGCACACGACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAAGGT
SPTSTEETSTEPS	ACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC
EGSAPGTSESATPE	TGCAACCAAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGA
SGPGSEPATSSSET	CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTTCAGAGCCGGCCAGCAGCGGTTG
PGTSESATPESGPG	GAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCACGCCGAGTCTGGTCC
SEPATSGSETPGTS	GGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTTCGGCACCGGGTACTA
ESATPESGPGTSTE	GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCGAGT
PESGAPGTSESAT	TCTCCAACAGCACCGAAGAAGGTTCCCTTGCTGGTAGCCCCGAC
PESGPGSPAGSPTS	CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCCAACTTCTACTG
TEEGSPAGSPTSTE	AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTGGT
EGSPAGSPTSTE	ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACCTCTGA
TSESATPESGPGTS	GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTT
TEPSEGSAPGTSSES	CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACCTTCTGAGTCCGCAACGCTGAA
ATPESGPGSEPATSS	TCCGGTCTGGTTCTGAACCAAGTACTTCCGGCAGCGAAACCCC
GSETPGTSESATPE	AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTGGTACTT
SGPGSEPATSSSET	CCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGCGACCAAGGTTCTCCGGCTGGT
PGTSESATPESGPG	AGCCCCAGCACGACGAGGAGGGTACGTCTGAATCTGCAACGCC
TSTEPSEGSAPGSP	GGAATCGGGCCAGGTTTCGGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAAA
AGSPTSTEETSTES	CCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTGGC
ATPESGPGSEPATSS	AGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGGTTACCCGGC
GSETPGTSESATPE	AGGTAGCCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACGAGCCGA
SGPGSPAGSPTSTE	GCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGAG
EGSPAGSPTSTE	AGCGGTCCAGGCACCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC
TSTEPSEGSAPGTS	AGGTACTTCTGAGAGCGCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGGG
ESATPESGPGTSES	AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGGTTCGGAACCAAGCG
ATPESGPGTSESAT	ACCAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGGCGAGCGAGCCAAAC
PESGPGSEPATSSGS	GAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCGAGGGTTCTG
ETPGSEPATSSSET	CCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT

	PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEG SAPLSGRSDNHSP GLAGSGTAEEASAS GEVQLLESGGGLVQ PGSSLKLSAASGF TFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNAYL QMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYVSW FAYWQGTLLVTVSS GATPPETGAETESP GETTGSAESEPPG EGELVVTQEPSTLV SPGGTVTLTCRSST GAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVL	AGCGAACCTGCGACGTCTGGTCTGAAACGCCGGGTACCAGCGA AAGCGCTACCCAGAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCCGAGCCAT CGGAGGGCTCCGCACTgTCAggtCGTtctGATaacCATtcc CCActgGGTctgGCTGGGTCTGGCACCGCCGAAGCAGCTagcg ctctGGCGAGGTTCAGTTGTTGGAAGCGGGGGCGGGCTTGTCC AACCTGGAGGTTTCATTAATAATGAGCTGTGAGCCTCCGGATT ACCTTTAACACGTATGCAATGAACCTGGGTCCGTCAAGCGCCCGG TAAGGGGCTGGAGTGGGTAGCTCGCATCCGCTCGAAGTATAATA ATTACGCAACCTACTACGCAGACAGTGTCAAAGATCGCTTCACT ATCTCACGCGACGACAGTAAGAACACGGCCTACTTACAGATGAA CAATCTTAAACGGAGGACACCGCTGTCTACTACTGCGTGCGCC ACGGGAATTTCCGTAACTCTTATGTAAAGTTGGTTCGCATATTGG GGACAAGGTACGTTGGTAACCGTATCCAGCggtgcgaccccgcc ggaacccggtgcggaacccgaagcccggtgaaaccaccggtg gcagcgcgagagcgaaacccggtgaaggtGAACCTGGTCGTC ACGCAGGAGCGTCCCTTACCGTTTACCAGGTGGAACAGTGAC TCTGACGTGTCGCTCCTCCACTGGGGCGGTACAACCTTCAATT ATGCTAATTGGGTCCAGCAGAAGCCGGGCCAAGCCCTCCGGG TTGATTGGCGGCACCAACAACTGCTCCAGGGACACCTGCCCG TTTTTCGGGCTCCTTATTGGGGGGCAAAGCTGCACTGACGTTGT CTGGAGTTCAGCCGAGGATGAGGCAGAGTATTACTGCGCATTG TGGTATTCTAATTATGAGGTTTGGAGGCGGCACAAAGCTGAC CGTCCTG
TBP-16	HHHHHHGGSPAGSP TSTEEGTSESATPE SGPSTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPSTSESATPESG TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGS	CATCACCAACATCATCgAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAAC CTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCTACTCCAGAATCCG GTCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTCTTGTCTCAGGC TCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGT CCGAAGGCAGTGTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAA TCCGGCCCTGGTTCTGAGCCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTTCAC CGGCGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCG GCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCGAGCCGAGCGA GGGTTCAGCCCCGGGTACCGACCGGAGCCGTCCGAGGGTAGCG CACCGGTTCTCCGGCGGGTCCCTACGTCTACGGAAGAGGGT ACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGGCCAGGCACACGAC TGAACCGAGCGAAGGCAGCGACCTGGCACTAGCGAGTCTGCGA CTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAGCGAAGGC AGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAACTCGGCC GGGTTCAGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTT CCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAA CCATCCGAAGGTCCGCTCCTGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCC TGAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGAGCG GTCCAGGCTCTCCAGCAGGTCTCCAACCTCCACTGAAGAAGGC ACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACC TGCTACCTCTGGTTCGGAACCTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGA CTCCGGAATCTGGCCCGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGGT AGCGCACCAAGTACCAGCACTGAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACC GGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTCTGCGCCGGGTACCT CCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAAGTACTAGCACGGAA

PGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPSESPATSGSET PGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSESPATS GSETPGTSESATPE SGPSESPATSGSET PGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSESPATS GSETPGTSESATPE SGPSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESAT PESGPGSESPATSGS ETPSESPATSGSET PGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSE SAPLSGRSDNHVPL SLKMGGTAEASAS GEVQLLESGGGLVQ PGSLKLSAASGF TFNTYAMNWRQAP KGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFNGSYVSW FAYWQGTLVTVSS GATPPEETGAETESP GETTGGSAESEPPG EGELVVVTQEPSTLV SPGGTVTLTCSRST GAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSL	CCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCGTCGGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAAGCACCG AAGAAGGCACCAGCACCGAGCCGTCGGAAGGTTCCGCACCAGGT ACAAGCGAGAGCGCGACTCCTGAATCTGGTCCGGGTAGCGAGCC TGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACTTCCGAATCTGCGA CCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTTCAGAGCCGGCGACGAGCGGTTCCG GAAACGCCGGGTACGTCTGAATCAGCCAGCGCGGAGTCTGGTCC GGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGCACCAGGTTACTA GCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGGGCAGCCCGGAGGT TCTCCAACCAGCACCGAAGAAGGTTCCCTTGTGGTAGCCCGAC CTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCCAACTTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTCTGGT ACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACCTTCTGA GTCTGCTACTCCAGAAAGCGGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTT CTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCCCTGAA TCCGGTCTGGTCTGAACCAGCTACTTCCGCGAGCGAAACCC AGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGGTCTCTGGTACTT CCACTGAGCCTAGCGAGGTTCCCGACAGGTTCTCCGGCTGGT AGCCCGACCGAGCAGGAGGAGGTACGTCTGAATCTGCACACGCC GGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTTCTGGCAGCGAAA CCCCGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTCTGGC AGCCCTGCTGGTCTCCAACCTCTACCGAGGAGGTTCTACCGGC AGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGCACCGAGCCGA GCGAGGGTAGTCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCACCGCAGAG AGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCC AGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCG AGCCGGCAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGGTTCCGAACCGAGCG ACCAGCGGTTCTGAACCTCCGGGTAGCCCGGAGGAGCCCAAC GAGCACCGAAGAGGTTACGAGCAGGAACCGAGCGAGGTTCTG CCCCGGTACTTCCACCGAACCATCGAGGGCTCTGCACTCTGGT AGCGAACCTGCGACGTCTGGTCTGAACGCCGGGTACCAGCGA AAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCAT CGGAGGGTCCGCACTgTCAggtCGTtctGATaacCATgtt CCActgTCTctgAAAatgGGTGGCACCCGCGAAGCAGCTagcgc ctctGGCGAGGTTCAgTtGTtGGAAAGCGGGGGCGGGTCTGTCC AACCTGGAGGTTCAATAAAATGAGCTGTGCAGCCTCCGATTC ACCTTTAACCGTATGCAATGAACGGGTCCGTCAAGCGCCCCG TAAGGGGCTGGAGTGGGTAGCTCGCATCCGTCGAGATATAATA ATTACGCAACCTACTACGACAGAGTGTCAAAGATCGCTTCACT ATCTACGCGACGACAGTAAGAACACCGGCCTACTTACAGATGAA CAATCTTAAACCGAGGACACCGCTGTCTACTACTGCGTGCGCC ACGGGAATTTCCGTAACCTTATGTAAGTTGGTTCCGATATTGG GGACAAGGTACGTGGTAACCGTATCCAGCGgtgacaccccgcc ggaacccggtgcggaacccgaaagcccggtgaaacacacccggtg gcagcgcgagagcgaaaccccggtgaaagtgAACTGGTCTCGTC ACGCGAGGAGCCCTCCCTTACCGTTTACCAGGTGGAACAGTGAC TCTGACGTGTCTGCTCCCTCCACTGGGGCGGTACAACTTCCAAT ATGCTAATTGGGTCCAGCAGAGCGCGGCCAAGCCCTCCGCGG TTGATTGGCGGCCACCAACAAACGTGCTCCAGGGACACCTGCCCG TTTTTCGGGCTCCTTATTTGGGGGGCAAAGCTGCACGTGACGTTGT CTGGAGTTCAGCCGGAGGATGAGGCAGAGTATTACTGCGCATTG TGGTATTCTAATTATGGGTTTTTGGAGCGCGCACAAAGCTGAC CGTCCTG
LGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVL	

5. Гибкие линкеры.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены гибкие линкеры для присоединения друг к другу соответствующих связывающих доменов в заявленных композициях. В некоторых воплощениях изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие первый scFv и второй scFv, при этом VL и VH каждого scFv соединены вместе длинным линкером из гидрофильных аминокислот, выбранным из последовательностей, приведенных в табл. 8, и scFv соединены вместе коротким линкером из гидрофильных аминокислот, выбранным из группы последовательностей, приведенных в табл. 9. В одном из воплощений длинный линкер, использованный для присоединения VL и VH друг к другу, представляет собой L7 из табл. 8, а межмолекулярный линкер, который соединяет два scFv, представляет собой S-1 из табл. 9. В другом воплощении изобретения предложены композиции химерного полипептидного комплекса, содержащие одноцепочечное диатело, в котором, после фолдинга, первый домен (VL или VH) соединяется в пару с последним доменом (VH или VL) с образованием одного scFv, и эти два домена в середине соединяются в пару с образованием другого scFv, при этом первый и второй домены, а также третий и последний домены соединены вместе коротким линкером из гидрофильных аминокислот, выбранным из последовательностей, приведенных в табл. 9, а второй и третий вариабельные домены соединены длинным линкером, выбранным из табл. 8. Как будет понятно специалисту в данной области техники, выбор короткого линкера и длинного линкера необходим для предотвращения некорректного образования пар соседних вариабельных доменов, что облегчает тем самым образование конфигурации диатела.

Таблица 8

Внутримолекулярные длинные линкеры

№ линкера	Название	Аминокислотная последовательность
L1	(G4S)3	GGGGSGGGSGGGGS
L2	MT110_18	GEGTSTGSGGSGGSGGAD
L3	MT103_18	VEGGSGGSGGSGGSGGVD
L4	UCHT1_29	RTSGPGDGGKGGPGKGPGEGETKGTGPGG
L5	Y30	GSSEGESEGGEGEGSEGESEGESEGESEGG
L6	Y32	TGSEGESEGGEGEGSEGESEGESEGESEGGT
L7	G1_30_3	GATPPETGAETESPGETTGSSEPPGEG
L8	G9_30_1	GSAAPTAGTTSPASPAPPTGGSSAAGSPST
L9	Y30_модифицированный	GEGGESGGSEGESEGESEGGSGGEGESEGG
L10	G1_30_1	STETSPSTPTESPEAGSGSGSPESPSGTEA
L11	G1_30_2	PTGTTGEPSEGESEPEGSAPTSSSTSEATPS
L12	G1_30_4	SESESEGEAPTGPASTTPEPSESPTPETS
L13	UCHT1_модифицированный	PEGGESGEGTGPGTGGEPEGEGGPGGEGGT

Таблица 9

Межмолекулярные короткие линкеры

Название	Аминокислотная последовательность
S-1	SGGGGS
S-2	GGGGS
S-3	GGG
S-4	GSP

6. Конфигурации химерного полипептидного комплекса.

Цель изобретения заключается в разработке композиций химерного полипептидного комплекса, которые сконструированы и созданы в пролекарственной форме для придания им определенных свойств, обусловленных со структурой, активностью, а также фармацевтических и фармакологических свойств. Строение заявленных композиций обусловлено по меньшей мере тремя важными свойствами: 1) необходимостью получения композиций, имеющих биспецифично связывающие домены, обладающие способностью одновременно связываться с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью, с образованием в результате иммунологического синапса; 2) необходимостью обеспечения композиций объемной группировкой, которая а) экранирует связывающие домены и снижает аффинность связывания с целевыми антигенами, когда композиция находится в интактной пролекарственной форме, б) обеспечивает достижение более продолжительного периода полувыведения при введении субъекту, в) ослабляет экстравазацию в нормальные ткани и органы по сравнению с экстравазацией в пораженные заболеванием ткани (например, опухоли) и г) обуславливает улучшенный профиль безопасности по сравнению с традиционными терапевтическими средствами на основе биспецифичных цитотоксических антител; и 3) способностью активироваться при расщеплении одной или несколькими протеазами млекопитающих при нахождении в непосредственной близости от пораженных заболеванием тканей, с высвобождением тем самым биспецифично связывающего домена, вследствие чего он полностью восстанавливает свою способность к аффинному связыванию с целевыми антигенами. В строении заявленных композиций используется преимущество, обусловленное свойствами таких компонентов, как XTEN и пептидный отделяемый сегмент (RS), и их расположение относительно биспецифично связывающих доменов первой части обеспечивает реализацию указанных выше свойств.

Без связи с конкретной теорией считается, что в результате использования описанного выше формата биспецифично связывающих доменов высвободившиеся связывающие домены способны вызывать цитотоксический эффект на клетках-мишенях посредством рекрутмента цитотоксических эффекторных клеток без какой-либо потребности в пре- и/или коактивации. Кроме того, независимость от пре- и/или коактивации эффекторной клетки может в значительной степени способствовать исключительно высокой цитотоксичности, опосредуемой высвободившимися связывающими доменами. В некоторых воплощениях высвободившийся второй связывающий домен сконструирован с такими специфичностями связывания, что он обладает способностью направленно взаимодействовать с цитотоксическими эффекторными клетками (например, Т-клетками, NK клетками, цитокин-индуцируемой киллерной клеткой (CIK клеткой)), с предварительно выбранными поверхностными антигенами на опухолевых клетках у субъекта, в то время как первый связывающий домен сконструирован со специфичностями связывания с опухолевыми маркерными антигенами, ассоциированными с опухолевыми клетками, тем самым образуется иммунологический синапс и осуществляется избирательное, направленное и локализованное действие высвободившихся цитокинов и эффекторных молекул против опухоли-мишени, в результате чего опухолевые клетки

повреждаются или разрушаются, что выражается в противоопухолевом действии и терапевтической пользе для субъекта. В одном из воплощений высвободившийся второй связывающий домен связывается с антигеном эффекторной клетки, который способен модулировать одну или несколько функций эффекторной клетки, приводя к или способствуя цитолитическому воздействию на опухолевую клетку-мишень. Антиген эффекторной клетки может экспрессироваться эффекторной клеткой или другими клетками. В некоторых воплощениях антиген эффекторной клетки экспрессируется на клеточной поверхности эффекторной клетки. Неограничивающими примерами являются CD3, CD4, CD8, CD25, CD38, CD69, CD45RO, CD57, CD95, CD107 и CD154. В других воплощениях антиген эффекторной клетки представляет собой Th1-цитокин, выбранный из IL2, IL10, IL12, IFN γ и TNF α . Таким образом, специалисту в данной области техники будет понятно, что конфигурации заявленных композиций предназначены для избирательной или непропорциональной доставки активной формы композиции к опухолевой ткани-мишени или раковой клетке-мишени по сравнению со здоровой тканью или здоровыми клетками у субъекта, которому вводят такую композицию, с получением в результате этого терапевтической пользы. Как очевидно на основании изложенного выше, данным изобретением предложено большое семейство полипептидов в разработанных конфигурациях, предназначенных для достижения желаемых свойств.

В случае использования XTEN в качестве объемной группировки заявленные композиции, которые получаются XTEN-илированными, приобретают несколько уникальных и благоприятных физико-химических и фармакологических свойств. Неограничивающие примеры улучшенных свойств заявленных композиций включают повышение общей растворимости и стабильности в процессе метаболизма, более низкую восприимчивость к протеолизу в процессе циркуляции, ослабленную иммуногенность, более низкую скорость всасывания при введении подкожно или внутримышечно, сниженный почечный клиренс, сниженную токсичность, экранирующий эффект XTEN на связывающие группировки первой части до момента высвобождения в результате расщепления RS и улучшенные фармакокинетические свойства. В частности, конкретно предполагается, что строение заявленных композиций обуславливает более высокий терапевтический индекс и сниженные токсичность или побочные эффекты, что достигается благодаря сочетанию экранирующего эффекта и стерических затруднений, оказываемых XTEN на аффинность связывания применительно к связывающим доменам первой части в пролекарственной форме, но при этом сохраняется способность к высвобождению биспецифично связывающих доменов (что достигается путем включения в состав RS расщепляемой пептидной последовательности) вблизи от или в пределах ткани-мишени (например, опухоли), которая продуцирует протеазу, для которой RS является субстратом.

Согласно одному из аспектов, где XTEN применяют в композициях в качестве носителя, данное изобретение использует преимущество того открытия, что увеличение длины неповторяющихся, неструктурированных полипептидов усиливает неструктурированность XTEN и соответственно улучшает физико-химические и фармакокинетические свойства композиций, содержащих носитель XTEN. В общем случае, наличие XTEN с общей длиной больше примерно 400 остатков, включенного в композицию, приводит к достижению более продолжительного периода полувыведения по сравнению со случаями более короткой общей длины, например, короче, чем примерно 290 остатков. Без привязки к определенной теории отметим, что XTEN может принимать открытые конформации ввиду электростатического отталкивания между отдельными зарядами заряженных остатков, составляющих XTEN, а также вследствие внутренней гибкости, придаваемой конкретными гидрофильными аминокислотами в последовательности, которая лишена возможности образовывать вторичную структуру. В результате, использование таких заявленных XTEN оказывается выгодным отчасти потому, что они наделяют полученную композицию большим гидродинамическим радиусом, свойством, которое придает XTEN-илированной композиции соответственно более высокое значение кажущейся молекулярной массы по сравнению с композицией без XTEN. XTEN-илирование приводит к получению композиций, которые имеют более высокие значения гидродинамических радиусов, более высокие значения кажущейся молекулярной массы и более высокие значения фактора кажущейся молекулярной массы по сравнению с белком, не связанным с XTEN. Например, используя XTEN, можно эффективно увеличивать гидродинамический радиус композиции сверх размера пор в мембранах капилляров почечных клубочков, составляющего приблизительно 3-5 нм (это соответствует кажущейся молекулярной массе примерно 70 кДа) (Caliceti, 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv. Drug Deliv. Rev., 55: 1261-1277), что приводит к ослаблению почечного клиренса циркулирующих белков с соответствующим увеличением периода полувыведения в конечной фазе. Более высокий гидродинамический радиус, обуславливаемый XTEN, также способствует ослаблению экстравазации интактной пролекарственной формы композиций химерного полипептидного комплекса из кровеносной системы в области нормальной, здоровой ткани со средними размерами пор 5-12 нм, но позволяет молекулам интактной композиции покидать кровеносные сосуды, которые пронизывают опухоли, где межклеточные контакты эпителиальных клеток характеризуются большим размером пор. Давно известно о нарушении различных функций в сосудистой системе опухолей, как например, о более высокой проницаемости сосудов по сравнению с нормальными сосудами (Duran-Reynals, F. Studies on the localization of dyes and foreign proteins in normal and

malignant tissue. *Am. J. Cancer*, 35: 98-107 (1939); Babson AL, Winnick T. Protein transfer in tumor-bearing rats. *Cancer Res.*, 14: 606-611 (1954)). Нарушение таких функций было одной из причин достижения более высокой концентрации белков плазмы крови, обнаруженной в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями; это явление было исследовано Maeda и коллегами (Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46: 6387-6392 (1986); Maeda H, Matsumura Y. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 6: 193-210 (1989), которые описали его как эффект повышенной проницаемости и удержания, являющийся следствием сочетания повышенной проницаемости кровеносных сосудов опухоли и сниженной скорости клиренса через функциональные лимфатические сосуды в опухоль, окончательным итогом чего является накопление макромолекул в опухолях. Общеизвестно, что физиологический верхний предел размера пор в стенках капилляров большинства несинусоидальных кровеносных капилляров с точки зрения прохождения неэндогенных макромолекул лежит в диапазоне между 5 и 12 нм (Hemant Sarin. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenesis. Res.*, 2010, 2: 14), в то время как размер зазоров между эндотелиальными клетками в барьере между кровеносной системой и опухолью, как в случае опухолей головного мозга, так и в случае опухолей периферической нервной системы, как сообщается, составляет от 40 нм до 200 нм или больше в диаметре (Sarin H. et al. Physiologic upper limit of pore size in the blood-tumor barrier of malignant solid tumors. *J. Translational Medicine*, 2009, 7: 51). В соответствии с целью изобретения заявленные композиции химерного полипептидного комплекса конструировали с использованием преимущества этой разницы в размере пор, обусловленной присоединением объемной группировки, например, XTEN, в результате чего экстравазация интактного химерного полипептидного комплекса в нормальной ткани ослабляется, а в неплотном окружении сосудистой системы опухоли или в других очагах воспаления интактный комплекс может экстравазировать и активироваться протеазами, находящимися в окружении опухоли, с высвобождением первой части, содержащей домены, связывающиеся с эффекторными клетками и клетками-мишенями. В случае наличия RS в составе химерного полипептидного комплекса, в такой конструкции используется преимущество, заключающееся в том, что при нахождении химерного полипептидного комплекса вблизи пораженных заболеванием тканей, например опухоли, которая вырабатывает одну или несколько протеаз, последовательности RS, которые проявляют восприимчивость к одной протеазе или нескольким протеазам, экспрессированной(ым) данной опухолью, способны расщепляться под действием протеаз (описанных более подробно выше). Под действием протеазы происходит расщепление отделяемого сегмента (RS) композиции с высвобождением из композиции связывающих доменов первой части, уменьшение молекулярной массы и гидродинамического радиуса у высвободившихся биспецифично связывающих доменов первой части. Следует иметь в виду, что в результате уменьшения молекулярной массы и гидродинамического радиуса композиции, высвободившиеся биспецифично связывающие домены первой части также приобретают свойство, заключающееся в способности более свободно перемещаться в растворе, проходить в ткань и опухоли через поры меньшего размера и с большей легкостью экстравазировать внутрь опухоли через более крупные поры сосудистой системы опухоли, что приводит к прикреплению эффекторной клетки к опухолевой клетке и их связыванию. Это свойство может быть оценено с использованием анализов разных видов. В одном из воплощений, где RS химерного полипептидного комплекса расщепляется под действием протеазы млекопитающих, в результате расщепления и высвобождения биспецифично связывающих доменов первой части и высвобождения третьей части из указанной композиции указанная первая часть имеет коэффициент диффузии в забуференном фосфатом физиологическом растворе, значение которого по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или в 100 раз превышает таковое по сравнению с интактной композицией химерного полипептидного комплекса. В другом воплощении значение кажущейся молекулярной массы интактной композиции по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 10 раз больше, чем у первой части, высвободившейся в результате расщепления RS под действием протеазы млекопитающих, в случае определения кажущейся молекулярной массы посредством гель-проникающей хроматографии (SEC). В другом воплощении значение гидродинамического радиуса интактной композиции химерного полипептидного комплекса по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 10 раз больше, чем у первой части, высвободившейся в результате расщепления RS под действием протеазы млекопитающих, в случае определения гидродинамического радиуса посредством гель-проникающей хроматографии (SEC). В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом в результате расщепления второй части с высвобождением указанной первой части и указанной третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса значение гидродинамического радиуса высвободившейся первой части составляет менее чем примерно 30%, или менее чем примерно 40%, или менее чем примерно 50% от значения гидродинамического радиуса интактного химерного полипептидного комплекса, в случае определения гидродинамического радиуса посредством гель-проникающей хроматографии. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом в результате расщепления второй части с высвобождением

ем указанной первой части и указанной третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса значение гидродинамического радиуса высвободившейся первой части составляет менее чем примерно 5 нм, или менее чем примерно 4 нм, или менее чем примерно 3 нм, в случае определения гидродинамического радиуса посредством геля-проникающей хроматографии. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом высвободившаяся первая часть, имеющая гидродинамический радиус менее чем примерно 5 нм, или менее чем примерно 4 нм, или менее чем примерно 3 нм, в случае определения гидродинамического радиуса посредством геля-проникающей хроматографии, обладает более значительной способностью проникать в опухолевую ткань по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом значение гидродинамического радиуса интактного химерного полипептидного комплекса составляет более чем примерно 8 нм, или более чем примерно 9 нм, или более чем примерно 10 нм, в случае определения гидродинамического радиуса посредством геля-проникающей хроматографии и, при этом интактный химерный полипептидный комплекс обладает меньшей способностью экстравазировать из сосудистой системы нормальной ткани субъекта по сравнению с сосудистой системой опухолевой ткани.

Подразумевается, что заявленные композиции будут, благодаря своему строению и присоединению к XTEN, иметь улучшенные фармакокинетические свойства при введении субъекту по сравнению со случаем, когда соответствующие связывающие домены первой части не присоединены к XTEN. В одном из воплощений, для композиции химерного полипептидного комплекса продемонстрирован период полувыведения в конечной фазе у субъекта, который, в результате или после введения субъекту, по сравнению со случаем, когда соответствующая первая часть не находится в составе данной композиции, составляет по меньшей мере примерно в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 100 раз более высокое значение. В другом воплощении, для композиции химерного полипептидного комплекса продемонстрировано более высокое значение площади под кривой (AUC), в результате или после введения субъекту, по сравнению со случаем, когда соответствующая первая часть не находится в составе данной композиции, с превышением по меньшей мере на 25, 50, 100, 200% или по меньшей мере на 300% или больше. В другом воплощении, для композиции химерного полипептидного комплекса продемонстрирован более низкий объем распределения, в результате или после введения субъекту, по сравнению с соответствующей первой частью, которая не находится в составе данной композиции, с уменьшением по меньшей мере на 25, или 50, или 100, или 200, или по меньшей мере на 300%. В другом воплощении, для композиции химерного полипептидного комплекса продемонстрирован период полувыведения в конечной фазе, составляющий по меньшей мере примерно 20 ч, или по меньшей мере примерно 30 ч, или по меньшей мере примерно 32 ч, или по меньшей мере примерно 48 ч, или по меньшей мере примерно 72 ч, или по меньшей мере примерно 96 ч, или по меньшей мере примерно 120 ч, или по меньшей мере примерно 144 ч, или по меньшей мере примерно 7 суток, или по меньшей мере примерно 10 суток, или по меньшей мере примерно 14 суток, после введения субъекту. В частности, согласно другому аспекту предполагается, что благодаря строению заявленных композиций химерного полипептидного комплекса, которые предпочтительно активируются протеазой(ами), ассоциированной(ыми) с пораженной заболеванием тканью, такой как, но не ограничиваясь этим, опухолевая ткань, концентрация высвободившейся в кровоток субъекта первой части будет низкой, что тем самым способствует получению улучшенного профиля безопасности и снижению числа случаев побочных эффектов по сравнению с биспецифичными композициями, не имеющими защитной объемной группировки и отделяемого сегмента. В одном из воплощений изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом максимальная концентрация в плазме крови, $C_{\max}$, первой части, высвободившейся в результате или после однократного введения субъекту химерной полипептидной композиции, не превышает примерно 0,01 нг/мл, или примерно 0,03 нг/мл, или примерно 0,1 нг/мл, или примерно 0,3 нг/мл, или примерно 1 нг/мл, или примерно 10 нг/мл, или примерно 100 нг/мл. В другом воплощении изобретения предложен химерный полипептидный комплекс, при этом максимальная концентрация в плазме крови, $C_{\max}$, первой части, высвободившейся в результате или после однократного введения субъекту химерной полипептидной композиции, по меньшей мере в 3 раза ниже, или по меньшей мере в 10 раз ниже, или по меньшей мере в 30 раз ниже, или по меньшей мере в 100 раз ниже уровней интактного химерного полипептидного комплекса в плазме крови у того же субъекта. В упомянутых выше в данном абзаце воплощениях субъектом является мышь, или крыса, или собака, или обезьяна, или человек.

В другом воплощении, для композиции химерного полипептидного комплекса продемонстрировано более медленное всасывание после подкожной или внутримышечной инъекции субъекту по сравнению с соответствующей первой частью, не находящейся в составе такой композиции, в результате чего $C_{\max}$ составляет по меньшей мере на 25, 50, 100, 200 или по меньшей мере на 300% более низкое значение, что в свою очередь приводит к ослаблению неблагоприятных эффектов при применении композиций химерного полипептидного комплекса, что в совокупности приводит к увеличению периода времени, в течение которого конъюгированная композиция, введенная субъекту, обеспечивает или сохраняет терапевтическую активность.

Согласно другому аспекту, в частности, предполагается, что XTEN заявленного химерного поли-

пептида в композиции химерного полипептидного комплекса обуславливает как стерические затруднения, так и экранирующий эффект в отношении связывающих доменов первой части композиций, в результате чего и связывающийся с эффекторной клеткой компонент, и связывающийся с клеткой-мишенью компонент интактной пролекарственной формы обладают более низкой способностью взаимодействовать со своими соответствующими лигандами, но с тем, что после расщепления RS под действием протеазы и высвобождения XTEN и превращения пролекарственной формы комплекса в активированную форму оптимальная связывающая способность высвободившихся биспецифично связывающих компонентов восстанавливается. Таким образом, XTEN интактной композиции химерного полипептидного комплекса ингибирует связывание связывающих доменов с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени (например, EpCAM или HER2) и/или антигеном эффекторной клетки (например, антигеном CD3 T-клетки) по сравнению со связывающими доменами, высвободившимися в результате расщепления RS протеазой. В противоположность этому, связывающие домены первой части, высвободившейся из композиции под действием протеазы, обладают более высокой аффинностью связывания в отношении соответствующих им лигандов по сравнению со связывающими доменами интактной композиции химерного полипептидного комплекса. Цель изобретения заключается в том, чтобы аффинность связывания каждого связывающего домена первой части, высвободившейся из композиции химерного полипептидного комплекса, в отношении соответствующего целевого лиганда была выше по сравнению со связывающими доменами интактной композиции, как например, при определении в анализе связывания *in vitro*, который изложен в данном описании. В одном из воплощений аффинность связывания связывающегося с эффекторной клеткой домена, высвободившегося из композиции в результате расщепления RS протеазой, по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 6 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 8 раз, или по меньшей мере в 9 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз выше в отношении антигена эффекторной клетки по сравнению со связывающимся с эффекторной клеткой доменом интактной композиции химерного полипептидного комплекса, по результатам измерений в анализе *in vitro* с применением клеток в случае эффекторной клетки, имеющей указанный антиген эффекторной клетки на клеточной поверхности указанной клетки, или в ELISA с применением связанного с твердой фазой антигена эффекторной клетки. В одном из воплощений антиген эффекторной клетки представляет собой CD3. В других воплощениях аффинность связывания связывающегося с опухолевой клеткой домена, высвободившегося из композиции в результате расщепления RS протеазой, по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 6 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 8 раз, или по меньшей мере в 9 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз выше в отношении опухолеспецифического маркера или антигена клетки-мишени по сравнению со связывающимся с опухолевой клеткой доменом интактной композиции химерного полипептидного комплекса, по результатам измерений в анализе *in vitro* с применением клеток в случае опухолевой клетки, имеющей указанный антиген на клеточной поверхности указанной клетки, или в ELISA с применением связанного с твердой фазой антигена эффекторной клетки. В одном из упомянутых выше воплощений опухолеспецифический маркер или антиген клетки-мишени выбран из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), сialiрированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Ccr, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMPs, антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротейна (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. В частности, в приведенных в данном абзаце воплощениях предполагается, что экранирующий эффект XTEN распространяется на оба связывающих домена указанных выше воплощений интактной, пролекарственной формы химерного полипептидного комплекса и что в результате высвобождения XTEN из композиции химерного полипептидного комплекса посредством расщепления RS связывающая способность соответствующих связывающих доменов восстанавливается в полном объеме.

Цель изобретения заключается в том, чтобы присоединение объемной группировки к композиции приводило к экранирующему эффекту в интактной композиции химерного полипептидного комплекса, а сопутствующее ослабление связывания с Т-клетками и тканями-мишенями приводило к ослаблению

продуцирования связанных с Т-клетками Th1-цитокинов или других провоспалительных медиаторов в случае системного воздействия при введении субъекту, в результате чего общий побочный эффект и профиль безопасности улучшались бы по сравнению с биспецифично связывающими композициями, не имеющими в своем составе объемной группировки, такой как XTEN. Как важный компонент клеточного иммунитета, продуцируемые IL-2, TNF-альфа и IFN-гамма являются отличительными составляющими Th1-ответа (Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2000, 85(1): 9-18), в частности, в Т-клетках, стимулированных антителами к CD3 (Yoon S.H. Selective addition of CXCR3+CCR4-CD4+ Th1 cells enhances generation of cytotoxic T cells by dendritic cells in vitro. *Exp. Mol. Med.*, 2009, 41(3): 161-170), и IL-4, IL-6 и IL-10 также являются провоспалительными цитокинами, важными для цитотоксического ответа на композицию на основе биспецифичного антитела (Zimmerman Z., et al. Unleashing the clinical power of T cells: CD19/CD3 bi-specific T cell engager (BiTE®) antibody composition blinatumomab as a potential therapy. *Int. Immunol.* (2015) 27(1): 31-37). В некоторых воплощениях интактная, нерасщепленная композиция химерного полипептидного комплекса демонстрирует по меньшей мере в 2 раза, или по меньшей мере в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в 5 раз, или по меньшей мере в 6 раз, или по меньшей мере в 7 раз, или по меньшей мере в 8 раз, или по меньшей мере в 9 раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 1000 раз более низкий потенциал в отношении продуцирования Th1- и/или провоспалительных цитокинов в случае нахождения указанного комплекса в контакте с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью в основанном на использовании клеток анализе стимуляции цитокинов *in vitro* (как например, описанном ниже в разделе примеры) по сравнению с уровнями цитокинов, стимулированными соответствующими высвободившимися связывающими доменами первой части обработанной протеазой композиции химерного полипептидного комплекса в основанном на использовании клеток анализе стимуляции цитокинов *in vitro*, при этом цитокины выбраны из группы, состоящей из IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-альфа и IFN-гамма. В одном из упомянутых выше воплощений продуцирование Th1-цитокина исследуют в анализе *in vitro* с участием эффекторных клеток, таких как PBMC или CD3+ Т-клетки, и клеток-мишеней, имеющих опухолевеспецифический маркерный антиген, выбранный из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцина), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-О-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звук-вой еж" (Shh), Wue-1, антигена 1 плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), сигнализированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротеина (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. В еще одном из упомянутых выше воплощений цитокин представляет собой IL-2. В еще одном из упомянутых выше воплощений цитокин представляет собой TNF-альфа. В еще одном из упомянутых выше воплощений цитокин представляет собой IFN-гамма. В другом воплощении интактная нерасщепленная композиция химерного полипептидного комплекса, введенная субъекту, имеющему опухоль с антигеном, который может связываться со связывающим доменом высвободившейся первой части комплекса, демонстрирует по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз или по меньшей мере в 1000 раз более низкий потенциал в отношении продуцирования Th1- и/или провоспалительных цитокинов у субъекта по сравнению с уровнями цитокинов, продуцируемыми соответствующими высвободившимися связывающими доменами обработанной протеазой композиции химерного полипептидного комплекса у сопоставимого субъекта, имеющего опухоль. В упомянутом выше воплощении оценка цитокинов может быть проведена в образце крови, жидкости или ткани, взятых у субъекта. В упомянутом выше воплощении субъектом могут быть мышь, крыса, обезьяна и человек. Однако, в качестве преимущества заявленных композиций химерного полипептидного комплекса установлено, что цитолитические свойства композиций не требуют предварительной стимуляции цитокинами; что образования иммунологического синапса в случае эффекторной клетки, связанной с клеткой-мишенью посредством связывающих доменов первой части, достаточно, чтобы вызвать цитоллиз или апоптоз в клетке-мишени. Тем не менее, продуцированные провоспалительные цитокины являются полезными маркерами для оценки эффективности или эффектов,

обуславливаемых заявленными композициями химерного полипептидного комплекса, будь то в анализе *in vitro* или при мониторинге лечения субъекта с опухолью.

В соответствии с упомянутыми выше воплощениями, относящимися к связывающим доменам, предпочтительно, если сайт связывания, распознающий маркерный антиген опухолевых клеток, обладает высокой аффинностью связывания, чтобы захватывать клетки-мишени, которые должны быть разрушены с высокой эффективностью. Композиции химерного полипептидного комплекса по изобретению имеют преимущество в том, что они могут быть использованы несколько раз для цитолиза опухолевых клеток, поскольку в предпочтительных воплощениях связывающийся с клеткой-мишенью домен имеет аффинность со значением K_d в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*. Если аффинность биспецифично связывающего домена в отношении связывания с целевым опухолевым антигеном является слишком высокой, то такая композиция связывается с экспрессирующей опухолевой клеткой и остается на ее поверхности, что делает ее неспособной к высвобождению и связыванию с другой клеткой. В одном из воплощений связывающийся с эффекторной клеткой домен заявленной композиции химерного полипептидного комплекса имеет константу связывания от 10^{-5} до 10^{-7} М, как определено в анализе связывания *in vitro*, подобные примеры чего описаны в приведенном ниже разделе Примеры. В другом воплощении связывающийся с эффекторной клеткой домен заявленной композиции химерного полипептидного комплекса имеет константу связывания от 10^{-5} до 10^{-10} М, как определено в анализе связывания *in vitro*.

Согласно одному из аспектов, признаком разработанной композиции является то, что, когда RS в химерном полипептидном комплексе расщепляется под действием протеазы млекопитающих в окружении клетки-мишени, и комплекс превращается из пролекарственной формы в активированную форму в результате расщепления и высвобождения биспецифично связывающих доменов первой части и третьей части из указанной композиции, тогда указанная первая часть одновременно связывается с Т-клеткой, несущей антиген эффекторной клетки, например, CD3, и с опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер или антиген клетки-мишени, на который направлен первый связывающийся домен, вследствие чего эффекторная клетка активируется. В некоторых воплощениях, когда комплекс активируется посредством расщепления RS, последующее одновременное связывание с эффекторной клеткой и клеткой-мишенью приводит к повышению по меньшей мере в 3 раза, или в 10 раз, или в 30 раз, или в 100 раз, или в 300 раз, или в 1000 раз активации эффекторной клетки, при этом активацию оценивают по продуцированию цитокинов, цитолитических белков или лизису клетки-мишени в анализе *in vitro* с применением клеток. В другом воплощении в результате одновременного связывания с Т-клеткой, несущей антиген CD3 человека, и опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер или антиген клетки-мишени, обусловленного высвободившимися связывающими доменами первой части, образуется иммунологический синапс, при этом такое связывание приводит к высвобождению Т-клеточных эффекторных молекул, способных вызывать лизис опухолевой клетки. Неограничивающие примеры анализа *in vitro* для измерения степени активации и/или цитолиза эффекторных клеток включают анализ целостности клеточной мембраны, анализ в смешанной культуре клеток, метод сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), основанный на анализе йодида пропидия, анализ проникновения трипанового синего, фотометрический анализ высвобождения ферментов, ELISA, радиометрический анализ высвобождения ^{51}Cr , флуориметрический анализ высвобождения европия, анализ высвобождения кальция AM, фотометрический анализ содержания МТТ, анализ содержания ХТТ, анализ содержания WST-1, анализ с использованием аламарового синего, радиометрический анализ встраивания ^3H -Thd, оценку клоногенности с измерением активности в отношении деления клеток, флуориметрический анализ содержания родамина-123 с измерением трансмембранного градиента в митохондриальной мембране, анализ апоптоза с мониторингом экспонирования фосфатидилсерина посредством FACS, анализ с использованием теста TUNEL, основанный на ELISA, анализ каспазной активности и морфологический анализ клеток или другие анализы, известные в данной области техники для исследования цитокинов, цитолитических белков или лизиса клеток, либо методы из приведенного ниже раздела примеры.

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что в контексте лечения субъекта с использованием заявленных композиций химерный полипептидный комплекс присутствует в форме пролекарства и превращается в более активную форму, при попадании в определенное клеточное окружение, под действием протеаз, совместно с ним локализованных в этом клеточном окружении. В результате высвобождения из композиции под действием протеаз(ы), находящей(их)ся в ткани-мишени, второй связывающийся домен, обладающий специфичностью связывания с антигеном эффекторной клетки, и первый связывающийся домен, обладающий специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, полностью сохраняют свою способность одновременно связывать и соединять вместе эффекторную клетку и клетку-мишень с образованием иммунологического синапса. Образование иммунологического синапса приводит к тому, что эффекторная клетка становится активированной, со стимуляцией различных сигнальных путей, запускающих транскрипцию новых генов и высвобождение посредством экзоцитоза эффекторной молекулы, содержащейся в ее везикулах. В зависимости от типа эффекторной клетки высвобождаются разные цитокины и лимфокины; например, хелперные Т-клетки 1 типа (Th1) высвобождают такие цитокины, как IFN- γ и TNF- β , в то время как хелперные Т-

клетки 2 типа (Th2) высвобождают такие цитокины, как IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, которые стимулируют В-клетки, а цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) высвобождают такие цитотоксические молекулы, как перфорин и гранзимы, которые вызывают гибель мишени (все вместе они называются "эффекторными молекулами"). В частности, предполагается, что в результате одновременного связывания друг с другом и присоединения друг к другу эффекторной клетки и опухолевой клетки-мишени с участием высвободившихся биспецифично связывающих доменов первой части химерного полипептидного комплекса, при очень низких отношениях эффектора к мишени (Е:Т), на опухолевую клетку воздействуют эффекторные молекулы, высвобожденные эффекторной клеткой в пространство иммунологического синапса между этими клетками, что приводит к повреждению, перфорин-опосредуемому лизису, индуцированной гранзимом В гибели клеток и/или апоптозу опухолевой клетки. Таким образом, согласно другому аспекту признаком разработанной композиции является то, что при введении химерного полипептидного комплекса субъекту с опухолью пролекарственная форма остается в кровеносной системе в нормальной ткани, но обладает способностью экстравазировать в более проницаемой сосудистой системе опухоли, вследствие чего пролекарственная форма комплекса активируется протеазами, локализованными вместе с опухолью, и что высвободившийся второй связывающий домен первой части одновременно связывается с эффекторной клеткой (например, антигеном CD3 Т-клетки) и опухолевой клеткой, экспрессирующей опухолеспецифический маркер, на который направлен первый связывающий домен композиции, вследствие чего эффекторная клетка активируется и осуществляется лизис опухолевой клетки. В одном из упомянутых выше воплощений высвободившаяся в опухоли субъекта первая часть, одновременно связанная с опухолевой клеткой и эффекторной клеткой, демонстрирует более высокую способность активировать эффекторные клетки, по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз, или по меньшей мере в 300 раз, или по меньшей мере в 400 раз, или по меньшей мере в 500 раз, или по меньшей мере в 1000 раз более высокую по сравнению с соответствующей интактной композицией химерного полипептидного комплекса. В еще одном из упомянутых выше воплощений высвободившаяся в опухоли субъекта первая часть, одновременно связанная с опухолевой клеткой и эффекторной клеткой, демонстрирует более высокую способность лизировать опухолевую клетку, по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 200 раз, или по меньшей мере в 300 раз, или по меньшей мере в 400 раз, или по меньшей мере в 500 раз, или по меньшей мере в 1000 раз более высокую по сравнению с соответствующей интактной композицией химерного полипептидного комплекса. В упомянутых выше воплощениях активацию и/или цитотоксичность эффекторных клеток исследуют традиционными методами, известными в данной области техники, такими как цитометрическое определение активированных эффекторных клеток, анализ содержания цитокинов, измерение размера опухоли или гистопатологический метод. В упомянутых выше воплощениях субъектом может быть мышь, крыса, собака, обезьяна и человек.

Как очевидно на основании изложенного выше, данным изобретением предложено большое семейство полипептидов в разработанных конфигурациях, предназначенных для достижения желаемых свойств, конкретные формулы которых приведены в данном описании. В одном из воплощений изобретения предложена композиция химерного полипептидного комплекса с первой частью, содержащей первый связывающий домен и второй связывающий домен, второй частью, содержащей отделяемый сегмент, и третьей частью, содержащей объемную группировку. В данном воплощении изобретения предложена композиция, имеющая конфигурацию формулы I (изображенную от N-конца к С-концу):

(первая часть)-(вторая часть)-(третья часть) I,

где первая часть представляет собой биспецифичную, содержащую два scFv структуру, при этом первый связывающий домен обладает аффинностью специфического связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, а второй связывающий домен обладает аффинностью специфического связывания с эффекторной клеткой; вторая часть содержит отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться под действием протеазы млекопитающих; а третья часть представляет собой объемную группировку. В упомянутом выше воплощении связывающие домены первой части могут располагаться в таком порядке (VL-VH)1-(VL-VH)2, где "1" и "2" представляют собой первый и второй связывающие домены, соответственно, или (VL-VH)1-(VH-VL)2, или (VH-VL)1-(VL-VH)2, или (VH-VL)1-(VH-VL)2, при этом парные связывающие домены соединены полипептидным линкером, описанным в данном изобретении ниже. В одном из воплощений VL и VH первой части выбраны из табл. 1 и 2; RS выбран из группы последовательностей, приведенных в табл. 4; а объемная группировка выбрана из группы, состоящей из: XTEN; альбумин-связывающего домена; альбумина; IgG-связывающего домена; полипептидов, состоящих из пролина, серина и аланина; жирной кислоты; Fc домена; полиэтиленгликоля (ПЭГ), PLGA и гидроксипропилкарбамата. Там, где это желательно, объемная группировка представляет собой XTEN, имеющий по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5. В упомянутых выше воплощениях композиция представляет собой рекомбинантный слитый белок. В другом воплощении данные части соединены посредством химического конъюгирования. Схематичное представление конфигурации композиции формулы I приведено на фиг. 6.

В другом воплощении изобретения предложена композиция, имеющая конфигурацию формулы II

(изображенную от N-конца к С-концу):

(третья часть)-(вторая часть)-(первая часть) II,

где первая часть представляет собой биспецифичную, содержащую два scFv структуру, при этом первый связывающий домен обладает аффинностью специфического связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, а второй связывающий домен обладает аффинностью специфического связывания с эффекторной клеткой; вторая часть содержит отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться под действием протеазы млекопитающих; а третья часть представляет собой объемную группировку. В упомянутом выше воплощении связывающие домены первой части могут располагаться в таком порядке (VL-VH)1-(VL-VH)2, где "1" и "2" представляют собой первый и второй связывающие домены, соответственно, или (VL-VH)1-(VH-VL)2, или (VH-VL)1-(VL-VH)2, или (VH-VL)1-(VH-VL)2, при этом парные связывающие домены соединены полипептидным линкером, описанным в данном изобретении ниже. В одном из воплощений, VL и VH первой части выбраны из табл. 1 и 2; RS выбран из группы последовательностей, приведенных в табл. 4; и объемная группировка выбрана из группы, состоящей из: XTEN; альбумин-связывающего домена; альбумина; IgG-связывающего домена; полипептидов, состоящих из пролина, серина и аланина; жирной кислоты и Fc домена. Там, где это желательно, объемная группировка представляет собой XTEN, имеющий по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5. В упомянутых выше воплощениях композиция представляет собой рекомбинантный слитый белок. В другом воплощении данные части соединены посредством химического конъюгирования. Схематичное представление конфигурации композиции формулы II приведено на фиг. 6.

В другом воплощении изобретения предложена композиция, имеющая конфигурацию формулы III (изображенную от N-конца к С-концу):

(пятая часть)-(четвертая часть)-(первая часть)-(вторая часть)-(третья часть) III,

где первая часть представляет собой биспецифичную, содержащую два scFv структуру, при этом первый связывающий домен обладает аффинностью специфического связывания с опухолеспецифическим маркером или антигеном клетки-мишени, а второй связывающий домен обладает аффинностью специфического связывания с эффекторной клеткой; вторая часть содержит отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться под действием протеазы млекопитающих; третья часть представляет собой объемную группировку; четвертая часть содержит отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться под действием протеазы млекопитающих, который может быть идентичен второй части или отличаться от нее; а пятая часть представляет собой объемную группировку, которая может быть идентична третьей части или отличаться от нее. В упомянутом выше воплощении связывающие домены первой части могут располагаться в таком порядке (VL-VH)1-(VL-VH)2, где "1" и "2" представляют собой первый и второй связывающие домены, соответственно, или (VL-VH)1-(VH-VL)2, или (VH-VL)1-(VL-VH)2, или (VH-VL)1-(VH-VL)2, при этом парные связывающие домены соединены полипептидным линкером, описанным в данном изобретении ниже. В упомянутых выше воплощениях RS выбран из группы последовательностей, приведенных в табл. 4. В упомянутых выше воплощениях объемная группировка выбрана из группы, состоящей из: XTEN; альбумин-связывающего домена; альбумина; IgG-связывающего домена; полипептидов, состоящих из пролина, серина и аланина; жирной кислоты и Fc домена. Там, где это желательно, объемная группировка представляет собой XTEN, имеющий по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5. В упомянутых выше воплощениях композиция представляет собой рекомбинантный слитый белок. В другом воплощении данные части соединены посредством химического конъюгирования.

Заявленные композиции, с учетом их строения и конкретных компонентов, устраняют давно испытываемую потребность в разработке биспецифичных терапевтических средств, которые имеют более высокую селективность, более продолжительный период полувыведения и оказывают слабое токсическое действие и меньшее количество побочных эффектов, когда они расщеплены протеазами, обнаруживаемыми в ассоциированных с мишенью тканях или тканях, ставших нездоровыми в результате заболевания, вследствие чего заявленные композиции имеют улучшенный терапевтический индекс по сравнению с композициями на основе биспецифичных антител, известными в данной области техники. Такие композиции полезны в лечении некоторых заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, рак. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что в результате применения композиций по настоящему изобретению достигается ослабление неспецифичных взаимодействий посредством сочетания механизмов, включающих в себя стерические затруднения, обусловленные расположением связывающих доменов относительно объемных молекул XTEN, стерические затруднения, обусловленные гибкостью, неструктурированностью длинных гибких полипептидов XTEN, которые, будучи введены в состав композиции, способны выполнять колебательные движения и перемещаться относительно связывающих доменов, обеспечивая блокирование взаимодействия между композицией и тканями или клетками, а также обеспечивая ослабление способности интактной композиции проникать в клетку или ткань вследствие большой молекулярной массы (способности, обусловленной как фактической молекулярной мас-

сой XTEN, так и большим гидродинамическим радиусом неструктурированного XTEN) по сравнению с размером отдельных связывающих доменов. Однако, данные композиции сконструированы таким образом, что при своем нахождении вблизи ткани-мишени или клетки-мишени, несущей или секретирующей протеазу, способную расщеплять RS, либо при интернализации в клетку-мишень или ткань-мишень, когда связывающий домен связан с лигандом, биспецифично связывающие домены освобождаются от объемного XTEN под действием протеаз(ы), преодолевая обусловленный стерическими затруднениями барьер, и становятся более свободными для осуществления своего фармакологического эффекта. Заявленные композиции находят применение в лечении ряда состояний, при которых желательна избирательная доставка терапевтической композиции на основе биспецифичных антител в клетку, ткань или орган. В одном из воплощений тканью-мишенью является рак, который может представлять собой лейкоз, лимфому или опухоль органа или системы.

III. Фармацевтические композиции

Согласно настоящему изобретению предложены фармацевтические композиции, содержащие композиции химерного полипептидного комплекса. В одном из воплощений фармацевтическая композиция содержит химерный полипептидный комплекс и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В другом воплощении фармацевтическая композиция содержит химерный полипептидный комплекс по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, и возможно подходящие препараты носителей, стабилизаторов и/или эксципиентов. В другом воплощении фармацевтическая композиция содержит связывающуюся с Т-клеткой композицию по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, и возможно подходящие препараты носителей, стабилизаторов и/или эксципиентов. Подходящие эксципиенты и приемлемые носители включают: буферные агенты, такие как цитрат натрия, фосфат дикальция или фосфат натрия; консерванты; соразтворители; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие агенты, такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота); комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); полимеры, такие как сложные полиэфиры, полиоксиэтилен-стеараты, простые полиоксиэтилен-алкиловые эфиры, например, полиоксиэтилен-монолауриловый эфир, простые алкилфенилполиоксиэтиленовые эфиры (тритон-X), сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена и полиэтиленгликоли; солеобразующие противоионы, такие как ион натрия; многоатомные сахарные спирты; аминокислоты, такие как аланин, глицин, аспарагин, 2-фенилаланин и треонин; сахара или сахарные спирты, такие как трегалоза, сахароза, октасульфат, сорбит или ксилит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миоинозитола, галактоза, лактит, рибит, миоинозит, полисорбат, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит); серусодержащие восстанавливающие агенты, такие как глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, [альфа]-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин; и гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в соответствии с известными способами приготовления фармацевтически полезных композиций, где полипептид объединяют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем, таким как водные растворы или буферы, фармацевтически приемлемые суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей включают пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и растительные масла. Терапевтические препараты на основе фармацевтических композиций готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего желаемую степень чистоты, с возможными физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е издание, Osol, A. Ed. (1980), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Помимо этого, фармацевтические композиции также могут содержать другие фармацевтически активные соединения или множество композиций по изобретению.

Композиции по изобретению могут быть приготовлены с использованием ряда эксципиентов. Подходящие эксципиенты включают микрокристаллическую целлюлозу (например, авицел PH102, авицел PH101), полиметакрилат, поли(этилакрилат, метилметакрилат, триметиламмонийэтил-метакрилата хлорид) (например, Eudragit RS-30D), гидроксипропил-метилцеллюлозу (метоцел K100M, метоцел K100M марки премиум CR, метоцел E5, Opadry®), стеарат магния, тальк, триэтилцитрат, водную дисперсию этилцеллюлозы (Surelease®) и протаминсульфат. Агент с медленным высвобождением также может содержать носитель, который может содержать, например, растворители, диспергирующие среды, вещества покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, поддерживающие изотоничность и замедляющие всасывание агенты. В этих агентах с медленным высвобождением также могут быть использованы фармацевтически приемлемые соли, например, минеральные соли, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты или сульфаты, а также соли органических кислот, таких как ацетаты, пропионаты, малонаты или бензоаты. Композиция также может содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол, а также такие вещества, как увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты или поддерживающие pH агенты. В качестве носителя также могут быть использованы липосомы.

Фармацевтические композиции можно вводить для лечения любым подходящим путем, включая парентеральный (в том числе подкожный, подкожный с помощью инфузионного насоса, внутримышечный, внутривенный, интраартериальный и интрадермальный), можно вводить интравитреально, интракостально, внутрибрюшинно, интраабдоминально и легочным путем. Также очевидно, что предпочтительный путь будет варьировать в зависимости от состояния и возраста реципиента и подлежащего лечению заболевания.

В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию, содержащую химерный полипептидный комплекс в соответствии с воплощениями, описанными в данном изобретении, используют в способе лечения заболевания, включающем введение фармацевтической композиции субъекту с таким заболеванием в соответствии со схемой лечения, включающей одно или более последовательных введений с использованием терапевтически эффективной дозы. Схема лечения представляет собой часть предписанного цикла лечения. В одном из воплощений предписанный цикл лечения включает введение фармацевтической композиции два раза в неделю, каждую неделю, каждые 10 суток, каждые две недели, каждые три недели или каждый месяц на каждый цикл лечения. В другом воплощении, применение такой схемы лечения приводит к улучшению клинического параметра или конечного показателя, ассоциированного с таким заболеванием у субъекта, при этом клинический параметр или конечный показатель выбран из одной или любой комбинации из группы, состоящей из уменьшения размеров опухоли в виде полного, частичного или неполного ответа; времени до прогрессирования; времени до констатации отсутствия эффекта лечения; биомаркерной реакции; выживаемости без прогрессирования заболевания; выживаемости без признаков заболевания; времени до возникновения рецидива; времени до начала метастазирования; времени общей выживаемости; улучшения качества жизни и улучшения симптомов. В других воплощениях фармацевтическую композицию, содержащую химерный полипептидный комплекс по воплощениям, описанным в данном изобретении, готовили в виде лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта. В воплощениях, упомянутых в данном абзаце выше, заболеванием могут быть карцинома, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны, бластома, рак молочной железы, ER/PR+ рак молочной железы, Her2+ рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой кишки со злокачественным асцитом, муцинозные опухоли, рак предстательной железы, рак головы и шеи, рак кожи, меланома, рак мочеполовых путей, рак яичника, рак яичника со злокачественным асцитом, перитонеальный карциноматоз, серозная карцинома матки, рак эндометрия, рак шейки матки, колоректальный, рак матки, мезотелиома в брюшной полости, рак почки, опухоль Вильмса, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочный рак, рак желудка, рак тонкого кишечника, рак печени, гепатокарцинома, гепатобластома, липосаркома, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рак пищевода, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, эпителиальный рак, арренобластома, аденокарцинома, саркома и В-клеточный хронический лимфолейкоз. В одном из воплощений лекарственное средство готовят для введения субъекту парентеральным путем (посредством интраартериального или внутривенного путем). В другом воплощении лекарственное средство готовят для введения субъекту подкожным путем. В другом воплощении лекарственное средство готовят для лечения заболевания у субъекта посредством введения субъекту интрадермальным путем. Там, где это желательно, фармацевтическую композицию, содержащую химерный полипептидный комплекс по воплощениям, описанным в данном изобретении, готовят в виде лекарственного средства для лечения заболевания у субъекта, при этом введение осуществляют интраабдоминальным или внутрибрюшинным путем для лечения опухолей и/или асцита в брюшной полости.

Согласно другому аспекту изобретение относится к препаратам на основе фармацевтических композиций. В одном из воплощений фармацевтическая композиция может поставляться в виде лиофилизированного порошка, подлежащего разведению перед введением. В одном из воплощений фармацевтическая композиция может поставляться в виде лиофилизированного порошка, подлежащего разведению с использованием физиологического раствора, воды с 5% декстрозы (D5 water), раствора Рингера с лактатом и тому подобного, для введения. В другом воплощении данная композиция также может поставляться в жидкой форме, которую можно вводить пациенту непосредственно. В одном из воплощений фармацевтическую композицию поставляют в виде жидкости в предварительно наполненном шприце для однократной инъекции. В одном из воплощений фармацевтическую композицию поставляют в виде жидкости во флаконе. В другом воплощении фармацевтическую композицию поставляют в виде лиофилизированного порошка во флаконе. Что касается воплощений фармацевтических композиций в виде жидких препаратов, то желаемое свойство заключается в том, что такой препарат должен поставляться в форме, которая может проходить через иглу для внутривенного, внутримышечного, внутрисуставного или подкожного введения. В одном из воплощений фармацевтическая композиция находится в жидкой форме. В другом воплощении фармацевтическая композиция находится в предварительно наполненном шприце для применения в качестве однократной инъекции. В одном из воплощений фармацевтическая композиция приготовлена в забуференном физиологическом растворе в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мкМ, или по меньшей мере 10 мкМ, или по меньшей мере 100 мкМ, или по меньшей мере 1

мМ, или по меньшей мере 2 мМ, или по меньшей мере 3 мМ, или по меньшей мере 4 мМ, или по меньшей мере 5 мМ, или по меньшей мере 6 мМ, или по меньшей мере 7 мМ, или по меньшей мере 8 мМ, или по меньшей мере 9 мМ, или по меньшей мере 10 мМ, при этом такой раствор может быть пропущен через иглу калибра 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 или 32 для интрадермального, подкожного, внутривенного, интраартериального, интраабдоминального, внутрибрюшинного, интрапеченочного или внутримышечного введения. Для доставки фармацевтических композиций по изобретению также можно использовать шприцевые насосы. Такие устройства описаны в патентах США № 4976696, 4933185, 5017378, 6309370, 6254573, 4435173, 4398908, 6572585, 5298022, 5176502, 5492534, 5318540 и 4988337, содержания которых включены в данное описание посредством ссылки. Специалист в данной области техники, с учетом как описания данного изобретения, так и описания этих других патентов, может подготовить к работе шприцевой насос для продолжительного высвобождения композиций по настоящему изобретению.

IV. Способы и применения композиций химерного полипептидного комплекса

Согласно настоящему изобретению предложены расщепляемые композиции химерного полипептидного комплекса или ProTIA (протеаза-запускаемый иммунный активатор) и фармацевтические композиции, содержащие химерный полипептидный комплекс, полезные, в частности, в медицинских учреждениях; например, для предупреждения, лечения и/или уменьшения интенсивности симптомов некоторых видов рака, опухолей или воспалительных заболеваний.

Был использован ряд терапевтических стратегий с целью разработки композиций химерного полипептидного комплекса для применения в способах лечения субъекта с раковым заболеванием, включая модулирование Т-клеточных ответов путем направленного воздействия на TCR-опосредуемую передачу сигнала, в частности, с использованием VL- и VH-частей моноклональных антител к CD3 человека, которые находят широкое клиническое применение в схемах лечения иммуносупрессивными средствами. CD3-специфичное моноклональное антитело OKT3 было первым таким моноклональным антителом, одобренным к применению на людях (Sgro, Toxicology, 105 (1995), 23-29), и в настоящее время широко используется в клиниках в качестве иммуносупрессивного агента при трансплантации (Chatenoud L. Immunologic monitoring during OKT3 therapy. Clin. Transplant., 7: 422-430, 1993). Кроме того, моноклональные антитела к CD3 могут индуцировать частичную опосредованную Т-клетками передачу сигнала и клональную толерантность (Smith, J. Exp. Med., 185 (1997), 1413-1422). OKT3 аннулирует отторжение тканевого аллотрансплантата вероятнее всего путем блокирования функционирования всех Т-клеток, которые играют главную роль при остром отторжении. OKT3 взаимодействует с CD3-комплексом и блокирует его функционирование в мембране Т-клеток; при этом CD3-комплекс ассоциирован с антиген-распознающей структурой Т-клеток (TCR), что является существенным для передачи сигнала. Эти и другие подобные CD3-специфичные антитела способны вызывать различные Т-клеточные ответы, включая продуцирование цитокинов (Von Wussow. Human gamma interferon production by leukocytes induced with monoclonal antibodies recognizing T cells. J. Immunol., 127: 1197-1200 (1981)), пролиферацию и индукцию супрессорных Т-клеток. В зависимости от условий CD3-специфичное моноклональное антитело может либо ингибировать, либо индуцировать цитотоксичность (Kimball JA, et al. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. Transplant. Immunol., 3: 212-221 (1995)). Что касается рака, то были сделаны попытки применения цитотоксических Т-клеток для лизиса раковых клеток. Для осуществления лизиса клеток-мишеней необходимо, чтобы цитотоксические Т-клетки находились с ними в непосредственном контакте по типу "клетка-к-клетке"; TCR на цитотоксической Т-клетке должен распознавать и вступать в контакт с соответствующим антигеном на клетке-мишени. В результате этого образуется иммунологический синапс, который в свою очередь инициирует каскад передачи сигнала в цитотоксической Т-клетке, вызывая активацию Т-клетки и продуцирование ряда цитотоксических цитокинов и эффекторных молекул. Перфорин и гранзимы представляют собой высокотоксичные молекулы, которые хранятся в предварительно образованных гранулах, находящихся в активированных цитотоксических Т-клетках. После распознавания клетки-мишени цитоплазматические гранулы таких вступивших в контакт цитотоксических Т-клеток мигрируют по направлению к мембране цитотоксической Т-клетки, в конечном итоге сливаясь с ней и высвобождая свое содержимое непосредственным образом в пространство иммунологического синапса с образованием поры в мембране клетки-мишени, что вызывает разрушение плазматической мембраны опухолевой клетки. Образованная пора действует как место входа для гранзимов, семейства сериновых протеаз, которые вызывают апоптоз опухолевых клеток. Эти и другие эффекторные молекулы описаны более подробно выше. Согласно данному изобретению предложены способы использования биспецифичных композиций, которые сконструированы для направленного воздействия на ряд злокачественных клеток, таких как опухолевые клетки, в дополнение к эффекторным клеткам, с целью инициирования лизиса клеток-мишеней и достижения благоприятного терапевтического результата посредством описанных выше механизмов. Данные композиции разработаны таким образом, что один связывающий домен связывается и вступает в контакт с CD3 с целью активации цитотоксической Т-клетки, в то время как второй связывающий домен может быть сконструирован с возможностью направленного воздействия на ряд разнообразных антигенов клеток-мишеней, которые характерны для конкретных злокачественных новообразований, при этом они соединяются друг с другом для образования иммунологического синап-

са. Особое преимущество данной конструкции заключается в том, что такое физическое связывание цитотоксической эффекторной клетки и раковой клетки устраняет необходимость в процессировании антигена, необходимость в МНСI/β2-микроглобулине, а также в костимуляторных молекулах. Примеры важных маркеров опухолевых клеток включают молекулу адгезии эпителиальных клеток (Ер-САМ), гликопротеин клеточной поверхности, экспрессируемый в многочисленных солидных опухолях. Другим примером является HER2/неу, также экспрессируемый в нескольких солидных опухолях, таких как рак молочной железы. Другие маркеры раковых клеток и репрезентативные последовательности VL и VH, которые можно использовать для создания связывающих доменов композиций химерного полипептидного комплекса по изобретению, приведены в табл. 2 или описаны в данном изобретении. Ввиду наличия такого диапазона опухолеспецифических маркеров (более подробно описанных выше), которые могут быть использованы при конструировании различных воплощений заявленных композиций на основе антител, очевидно, что полученные композиции будут полезны против различных видов рака, включая солидные и гематологические опухоли. В одном из воплощений изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего опухоль. Подвергаемая лечению опухоль может содержать опухолевые клетки, происходящие из клетки, выбранной из группы, состоящей из стромальной клетки, фибробластов, миофибробластов, глиальных клеток, эпителиальных клеток, липоцитов, лимфоцитарных клеток, клеток сосудов, гладкомышечных клеток, мезенхимальных клеток, клеток ткани молочной железы, клеток предстательной железы, клеток почки, клеток головного мозга, клеток толстой кишки, клеток яичников, клеток матки, клеток мочевого пузыря, клеток кожи, клеток желудка, клеток мочеполовых путей, клеток шейки матки, клеток тонкого кишечника, клеток печени, панкреатических клеток, клеток желчного пузыря, клеток желчных протоков, клеток пищевода, клеток слюнных желез, клеток легкого и клеток щитовидной железы. Другое преимущество композиций заключается в том, что поскольку цитотоксические эффекторные клетки не расходуются в процессе повреждения/разрушения находящейся с ними в контакте раковой клетки-мишени после инициирования лизиса одной клетки-мишени, то активированная эффекторная клетка может высвобождаться и двигаться через находящуюся в данном месте ткань в направлении других раковых клеток-мишеней, связываться с целевым антигеном и инициировать лизис новых клеток. Кроме того, подразумевается, что в ограниченном определенном участке места, таким как солидная опухоль, высвобождение молекул эффекторной клетки, таких как перфорин и гранзимы, будет приводить к повреждению опухолевых клеток, которые расположены в непосредственной близости, но не находятся в связанном состоянии с рассматриваемой молекулой биспецифично связывающих доменов, результатом чего является остановка роста или регрессия опухоли.

Соответственно, применимость по изобретению будет пониматься таким образом, что: после введения терапевтически эффективной дозы фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, описанный в данном изобретении, субъекту с диагнозом рак или опухоль, имеющий(ая) маркер клетки-мишени, на данную композицию могут воздействовать протеазы, ассоциированные с раковыми или опухолевыми клетками, с высвобождением биспецифично связывающих доменов первой части, благодаря чему может образовываться иммунологический синапс посредством объединения клетки-мишени и эффекторной клетки, с получением того результата, что происходящие из эффекторной клетки эффекторные молекулы, способные вызывать лизис клетки-мишени, высвобождаются в пространство этого синапса, вызывая апоптоз, цитоллиз или гибель раковой или опухолевой клетки-мишени. Кроме того, специалисту в данной области техники будет очевидно, что применение композиций химерного полипептидного комплекса может приводить к устойчивому и более универсальному благоприятному терапевтическому эффекту, чем "просто гибель", после образования иммунологического синапса посредством связывания высвободившихся связывающих доменов с эффекторной клеткой и раковой клеткой-мишенью.

Согласно одному из аспектов изобретения относится к способам лечения заболевания у субъекта, такого как рак или воспалительное нарушение. В некоторых воплощениях изобретения предложен способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, описанный в данном изобретении. Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции может варьировать в соответствии с такими факторами, как болезненное состояние, возраст, пол и масса индивида и способность антитела или части антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Терапевтически эффективным количеством также является такое, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или вредные действия заявленных композиций. Профилактически эффективное количество относится к количеству фармацевтической композиции, необходимой в течение периода времени, требуемого для достижения желаемого профилактического результата.

В одном из воплощений способа лечения заболевания у субъекта данным заболеванием для лечения могут быть карциномы, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны, бластома, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак головы и шеи, любая форма рака кожи, меланома, рак мочеполовых путей, рак яичника, рак яичника со злокачественным асцитом, пери-

тонеальный карциноматоз, серозная карцинома матки, рак эндометрия, рак шейки матки, колоректальный рак, эпителиальное интраперитонеальное злокачественное образование со злокачественным асцитом, рак матки, мезотелиома в брюшной полости, раковые заболевания почки, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, желудочный рак, рак пищевода, рак желудка, рак тонкого кишечника, рак печени, гепатокарцинома, гепатобластома, липосаркома, рак поджелудочной железы, рак желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, эпителиальный рак, аденокарцинома, саркомы любого происхождения, первичные гематологические злокачественные новообразования, включая острый или хронический лимфоцитарные лейкозы, острый или хронический миелогенные лейкозы, миелолифферативное опухолевое заболевание или миелодиспластические расстройства, тяжелую миастению, Базедову болезнь, тиреоидит Хашимото или синдром Гудпасчера. Терапевтически эффективное количество может обеспечивать благоприятный эффект с точки зрения содействия лечению (например, излечивать или снижать тяжесть) или предотвращать возникновение (например, снижать вероятность рецидива) рака или опухоли. В другом воплощении способа лечения заболевания у субъекта фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или нескольких терапевтически эффективных доз, вводимых два раза в неделю, один раз в неделю, каждые две недели, каждые три недели или один раз в месяц. В другом воплощении способа фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или нескольких доз в течение периода времени, составляющего по меньшей мере две недели, или по меньшей мере один месяц, или по меньшей мере два месяца, или по меньшей мере три месяца, или по меньшей мере четыре месяца, или по меньшей мере пять месяцев, или по меньшей мере шесть месяцев. В другом воплощении способа субъекту вводят первую низкую иницирующую дозу, затем одну или несколько более высоких поддерживающих доз согласно схеме приема препарата, составляющей по меньшей мере две недели, или по меньшей мере один месяц, или по меньшей мере два месяца, или по меньшей мере три месяца, или по меньшей мере четыре месяца, или по меньшей мере пять месяцев, или по меньшей мере шесть месяцев. Вводимая начальная иницирующая доза выбрана из группы, состоящей из по меньшей мере примерно 0,005 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,01 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,02 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,04 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,08 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг, а одна или более чем одна вводимая(ые) последующая(ие) поддерживающая(ие) доза(ы) выбрана(ы) из группы, состоящей из по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,12 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,14 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,16 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,18 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,20 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,22 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,24 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,26 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,27 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,28 мг/кг, по меньшей мере 0,3 мг/кг, по меньшей мере 0,4 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,5 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,6 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,7 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,8 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,9 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,0 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,5 мг/кг или по меньшей мере примерно 2,0 мг/кг. В другом воплощении способа фармацевтическую композицию вводят субъекту интрадермально, подкожно, внутривенно, интраартериально, интраабдоминально, внутрибрюшинно, интратекально или внутримышечно. В другом воплощении способа фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или нескольких терапевтически эффективных болюс-доз или посредством инфузии в течение от 5 мин до 96 ч, как допускается в целях максимальной безопасности и эффективности. В другом воплощении способа фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или нескольких терапевтически эффективных болюс-доз или посредством инфузии в течение от 5 мин до 96 ч, при этом доза выбрана из группы, состоящей из по меньшей мере примерно 0,005 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,01 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,02 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,04 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,08 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,12 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,14 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,16 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,18 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,20 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,22 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,24 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,26 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,27 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,28 мг/кг, по меньшей мере 0,3 мг/кг, по меньшей мере 0,4 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,5 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,6 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,7 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,8 мг/кг, по меньшей мере примерно 0,9 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,0 мг/кг, по меньшей мере примерно 1,5 мг/кг или по меньшей мере примерно 2,0 мг/кг. В другом воплощении способа фармацевтическую композицию вводят субъекту в виде одной или нескольких терапевтически эффективных болюс-доз или посредством инфузии в течение периода времени от 5 мин до 96 ч, при этом в результате такого введения субъекту концентрация химерного полипептидного комплекса в плазме крови субъекта составляет от по меньшей мере примерно 0,1 нг/мл до по меньшей мере примерно 2 мкг/мл или больше, и этот уровень поддерживается в течение по меньшей мере примерно 3 суток, или по меньшей мере примерно 7 суток, или по меньшей мере примерно 10 суток, или по меньшей мере примерно 14 суток, или по меньшей мере примерно 21 сутки. В упомянутых выше воплощениях способа субъектом могут быть мышь, крыса, обезьяна и человек.

В частности, фармацевтические композиции, содержащие химерный полипептидный комплекс,

можно использовать для лечения эпителиального рака, предпочтительно аденокарцином, или минимального остаточного заболевания, более предпочтительно, солидной опухоли на ранней стадии, распространенной солидной опухоли или метастазирующей солидной опухоли. Помимо этого, фармацевтические композиции, содержащие химерный полипептидный комплекс, предложенный в данном изобретении, полезны для лечения сарком. Помимо этого, фармацевтические композиции, содержащие химерный полипептидный комплекс, предложенный в данном изобретении, полезны для лечения лимфом и лейкозов, в том числе первичных гематологических злокачественных новообразований, включая острый или хронический лимфоцитарные лейкозы, острый или хронический миелогенные лейкозы, миелопролиферативное опухолевое заболевание или миелодиспластические расстройства, В-клеточных расстройств, таких как В-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома, фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны, бластома, В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-CLL) и/или связанное с В-клетками аутоиммунное заболевание, такое как тяжелая миастения, Базедова болезнь, тиреоидит Хашимото или синдром Гудпасчера. Помимо этого, фармацевтические композиции, содержащие химерный полипептидный комплекс, предложенный в данном изобретении, полезны для лечения злокачественных новообразований, приводящих к асцитам, включая рак мочевого пузыря, рак яичника, рак яичника со злокачественным асцитом, перитонеальный карциноматоз, серозную карциному матки, рак эндометрия, рак шейки матки, колоректальный рак, рак матки, мезотелиому в брюшной полости, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак толстой кишки со злокачественным асцитом и рак желудка.

Согласно одному из аспектов изобретения предложен способ достижения благоприятного эффекта при раковом или опухолевом заболевании, опосредуемый введением фармацевтических композиций, содержащих композиции химерного полипептидного комплекса. В одном из воплощений способа по изобретению предложено применение фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, в способе лечения рака или опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, посредством введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, при этом один связывающий домен в композиции химерного полипептидного комплекса происходит из родительского антитела, которое связывается с антигеном CD3 эффекторной клетки, а второй связывающий домен происходит из родительского антитела, которое связывается с целевым антигеном эффекторной клетки, выбранным из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIR), сialiрированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротейна (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. В одном из воплощений способа введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции приводит к ликвидации или уменьшению интенсивности симптомов основного ракового или опухолевого расстройства, в результате чего у субъекта наблюдается улучшение несмотря на то, что этот субъект может быть все еще поражен основным расстройством.

В другом воплощении изобретения предложено применение фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, в способе лечения рака или опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, при этом один связывающий домен композиции химерного полипептидного комплекса происходит из родительского антитела, направленного на эффекторную клетку, выбранного из группы, состоящей из антител табл. 1, а второй связывающий домен происходит из родительского антитела, которое связывается с целевым антигеном клетки-мишени, выбранного из группы, состоящей из антител табл. 2. В другом воплощении изобретения предложено применение фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, в способе лечения рака или опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, при этом один связывающий домен композиции химерного полипептидного комплекса содержит последовательности VL и VH, происходящие из родительского антитела, направленного на эффекторную клетку, выбранные из группы последовательностей, приведенных в табл. 1, а второй связывающий домен содержит парные последовательности VL и VH, происходящие из родительского антитела, направленного на антиген клетки-мишени, выбранного из группы, состоящей из антител табл. 2. В другом воплощении изобретения предложено применение фар-

мацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, в способе лечения рака или опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, при этом один связывающий домен композиции химерного полипептидного комплекса содержит последовательности VL и VH, происходящие из родительского антитела, направленного на эффекторную клетку, присоединенные ко второму связывающему домену, который содержит парные последовательности VL и VH, происходящие из родительского антитела, направленного на антиген клетки-мишени, при этом такие присоединенные связывающие домены содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в табл. 13. В другом воплощении изобретения предложено применение фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в табл. 10 или 12. В одном из воплощений дозы фармацевтической композиции по данному способу вводят в виде болус-дозы. В другом воплощении каждую из доз фармацевтической композиции по данному способу вводят путем внутривенной инфузии. В другом воплощении каждую из доз фармацевтической композиции по данному способу вводят путем интраабдоминальной инфузии. В другом воплощении каждую из доз фармацевтической композиции по данному способу вводят путем интраартериальной инфузии. В другом воплощении каждую из доз фармацевтической композиции по данному способу вводят путем подкожной инъекции. В другом воплощении каждую из доз фармацевтической композиции по данному способу вводят путем внутримышечной инъекции. В воплощениях, упомянутых в данном абзаце выше, субъект выбран из группы, состоящей из мыши, крысы, собаки, обезьяны и человека.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способу лечения рака или опухоли у субъекта в соответствии со схемой лечения. В одном из воплощений изобретения предложен способ лечения рака или опухоли у субъекта, включающий введение субъекту с таким заболеванием в соответствии со схемой лечения, включающей одно или более последовательных введений терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей композицию химерного полипептидного комплекса, описанную в данном изобретении. В одном из воплощений изобретения предложен способ лечения рака или опухоли у субъекта, включающий введение субъекту с таким заболеванием в соответствии со схемой лечения, включающей одно или более последовательных введений терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, при этом в результате введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции достигается благоприятный терапевтический эффект. В другом воплощении изобретения предложен способ лечения рака или опухоли у субъекта, включающий введение субъекту с таким заболеванием в соответствии со схемой лечения, включающей одно или более последовательных введений терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, при этом применение такой схемы лечения приводит к улучшению у субъекта клинического параметра или конечного показателя, ассоциированного с таким заболеванием. В упомянутом выше воплощении клинический параметр или конечный показатель выбран из одной или любой комбинации из группы, состоящей из уменьшения размеров опухоли в виде полного, частичного или неполного ответа; времени до прогрессирования; времени до констатации отсутствия эффекта лечения; биомаркерной реакции; выживаемости без прогрессирования заболевания; выживаемости без признаков заболевания; времени до возникновения рецидива; времени до начала метастазирования; времени общей выживаемости; улучшения качества жизни и улучшения симптомов.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способу применения, в котором схема лечения представляет собой часть предписанного цикла лечения. В одном из воплощений данного способа предписанный цикл лечения в такой схеме лечения включает введение фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, два раза в неделю, каждую неделю, каждые 10 суток, каждые две недели, каждые три недели или каждый месяц на каждый цикл лечения. В другом воплощении способа схема лечения используется для лечения заболевания, при этом заболевание выбрано из группы, состоящей из карциномы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, бластомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака предстательной железы, рака головы и шеи, любой формы рака кожи, меланомы, рака мочеполовых путей, рака яичника, рака яичника со злокачественным асцитом, перитонеального карциноматоза, серозной карциномы матки, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, эпителиального интраперитонеального злокачественного новообразования со злокачественным асцитом, рака матки, мезотелиомы в брюшной полости, раковых заболеваний почки, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, желудочного рака, рака пищевода, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака печени, гепатокарциномы, гепатобластомы, липосаркомы, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, раковых заболеваний желчного прото-

ка, рака слюнных желез, рака щитовидной железы, эпителиального рака, аденокарциномы, сарком любого происхождения, первичных гематологических злокачественных новообразований, включая острый или хронический лимфоцитарные лейкозы, острый или хронический миелогенные лейкозы, миелопролиферативного опухолевого заболевания или миелодиспластических расстройств, тяжелой миастении, Базедовой болезни, тиреоидита Хашимото или синдрома Гудпасчера.

Согласно другому аспекту изобретение относится к улучшенным способам индуцирования гибели клетки-мишени, такой как раковая клетка, в которых используются композиции химерного полипептидного комплекса, при этом в результате применения данного способа происходит гибель клеток-мишеней или индуцируется апоптоз в клетке-мишени или ткани-мишени, но со сниженной токсичностью и сниженными побочными эффектами. Особое преимущество способов по изобретению заключается в том, что улучшенные свойства композиций химерного полипептидного комплекса позволяют разработать более низкодозовые фармацевтические композиции или способы лечения, в которых используют более низкую дозировку, менее частое введение и более совершенный режим введения доз, как благодаря направленной доставке в ткани и клетки, так и благодаря улучшенным фармакокинетическим свойствам, что приводит к превосходному терапевтическому индексу, т.е. улучшенной эффективности при сниженной токсичности. В связи с этим заявленные композиции могут иметь превосходную эффективность и безопасность по сравнению со случаем, когда соответствующие связывающие домены первой части не присоединены к RS и объемной группировке, ввиду способности присоединенной объемной группировки уменьшать неспецифическое связывание со здоровыми тканями и предотвращать экстравазацию из кровеносной системы в здоровую ткань при одновременном обеспечении усиления проникновения в раковую или опухолевую ткань и связывания с ней после расщепления RS и высвобождения биспецифично связывающих доменов первой части; таким образом, это приводит к по-разному протекающему распределению в пространстве пролекарственной формы по сравнению с высвободившейся первой частью после расщепления композиции. В одном из воплощений изобретения предложен способ индуцирования гибели клетки-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени и эффекторной клетки с химерным полипептидным комплексом, описанным в данном изобретении, при этом результатом такого контакта является оказание воздействия на клетку-мишень, выбранное из группы, состоящей из утраты целостности мембраны, пикноза, кариорексиса, стимулирования внутреннего пути апоптоза, стимулирования внешнего пути апоптоза, апоптоза, лизиса клетки и гибели клетки. Данный эффект может быть определен в анализе *in vitro* с применением клеток, в котором используется смешанная популяция клеток-мишеней и эффекторных клеток и эффективное количество химерного полипептидного комплекса, обладающего аффинностью связывания с антигенами клетки-мишени и эффекторной клетки. Неограничивающие примеры антигенов клеток-мишеней включают, но не ограничиваются этим опухолеспецифический маркерный антиген, выбранный из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-О-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена I плазматических клеток, хондроитинсульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIIR), сialiрированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолеассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP, антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротеина (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2, и эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, при этом антиген эффекторной клетки представляет собой CD3.

В других воплощениях изобретения предложены способы индуцирования гибели клетки-мишени у субъекта, имеющего рак, содержащий популяцию клетки-мишени. В одном из воплощений способа данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс. В другом воплощении способа данный способ включает введение химерного полипептидного комплекса в виде одной или нескольких последовательно вводимых терапевтически эффективных доз фармацевтической композиции. В другом воплощении способа данный способ включает определение количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, необходимого для достижения терапевтического эффекта у субъекта, имеющего рак, и введение данного количества субъекту в виде одной или нескольких последовательных доз. В указанных выше способах рак выбран из группы, состоящей из карциномы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, бластомы, рака молочной железы, ER/PR+ рака

молочной железы, Her2+ рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, рака толстой кишки, рака толстой кишки со злокачественным асцитом, муцинозных опухолей, рака предстательной железы, рака головы и шеи, рака кожи, меланомы, рака мочеполовых путей, рака яичника, рака яичника со злокачественным асцитом, перитонеального карциноматоза, серозной карциномы матки, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, рака матки, мезотелиомы в брюшной полости, рака почки, опухоли Вильмса, рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, желудочного рака, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака печени, гепатокарциномы, гепатобластомы, липосаркомы, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, раковых заболеваний желчного протока, рака пищевода, рака слюнных желез, рака щитовидной железы, эпителиального рака, аренобластомы, аденокарциномы, саркомы и В-клеточного хронического лимфолейкоза. В другом воплощении данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, где способ приводит к улучшению клинического параметра или конечного показателя. Типичные клинические параметры или конечные показатели могут представлять собой общую выживаемость, конечные показатели симптомов, выживаемость без признаков заболевания, частоту объективных ответов, полный ответ, продолжительность ответа, выживаемость без прогрессирования заболевания, время до прогрессирования, время до констатации отсутствия эффекта лечения, показатель опухоли, размер опухоли, частоту ответа опухоли, время до начала метастазирования и концентрацию биомаркера. В другом воплощении данный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, при этом применение данного способа приводит к уменьшению частоты возникновения, продолжительности или ослаблению тяжести выявленных при постановке диагноза побочных эффектов у такого субъекта по сравнению со случаем введения сопоставимому субъекту сопоставимой дозы, в ммоль/кг, заявленной композиции, содержащей первую часть при отсутствии второй части и третьей части химерного полипептидного комплекса, при этом побочные эффекты выбраны из группы, состоящей из повышенных уровней IL-2 в плазме крови, повышенных уровней TNF-альфа в плазме крови, повышенных уровней IFN-гамма в плазме крови, сепсиса, фебрильной нейтропении, нейротоксичности, судорог, энцефалопатии, синдрома высвобождения цитокинов, расстройства речи, нарушения равновесия, лихорадки, головной боли, спутанности сознания, гипотензии, нейтропении, тошноты, нарушенного сознания, дезориентировки и повышенных уровней ферментов печени.

В одном из воплощений способ включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, субъекту, нуждающемуся в этом, что приводит к улучшению по меньшей мере одного параметра, конечного показателя, физиологического состояния или клинического результата, опосредуемого биспецифично связывающими доменами первой части. Такие способы предполагают введение фармацевтической композиции любым путем, соответствующим подвергаемому лечению заболеванию, расстройству или состоянию, в том числе интратрахеально, подкожно, внутримышечно, интраабдоминально или внутривенно.

Способы по изобретению могут включать введение последовательных доз терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции в течение периода времени, достаточного для достижения и/или поддержания желаемого параметра или клинического эффекта, и с учетом таких последовательных доз терапевтически эффективного количества устанавливают терапевтически эффективный режим введения доз для фармацевтической композиции, т.е. схему для последовательно вводимых доз, при этом дозы назначают в терапевтически эффективных количествах для достижения в результате устойчивого благоприятного эффекта на любой клинический признак или симптом, аспект, измеряемый параметр или характерную особенность ракового болезненного состояния или заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, те типы рака опухоли, которые описаны в данном изобретении.

С точки зрения способов по изобретению более длительно действующие композиции химерного полипептидного комплекса или фармацевтические композиции, содержащие композиции химерного полипептидного комплекса, являются предпочтительными с точки зрения улучшения удобства приема пациентом, для увеличения интервала между введением доз и для уменьшения количества лекарственного средства, необходимого для достижения устойчивого эффекта. В одном из воплощений способ лечения включает введение терапевтически эффективной дозы фармацевтической композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, субъекту, нуждающемуся в этом, что приводит к увеличению промежутка времени нахождения в пределах терапевтического окна, установленного для направленно действующих компонентов фармацевтической композиции, по сравнению с соответствующими направленно действующими компонентами, не находящимися в виде слитого белка и введенными субъекту в сопоставимой дозе. В некоторых случаях увеличение промежутка времени нахождения в пределах терапевтического окна превышает по меньшей мере примерно в три раза, или по меньшей мере примерно в четыре раза, или по меньшей мере примерно в пять раз, или по меньшей мере примерно в шесть раз, или по меньшей мере примерно в восемь раз, или по меньшей мере примерно в 10 раз, или по меньшей мере примерно в 20 раз, или по меньшей мере примерно в 40 раз, или по меньшей мере примерно в 50 раз, или по меньшей мере примерно в 100 раз таковое по сравнению с соответствующими направленно дейст-

вующими компонентами, не находящимися в виде слитого белка и введенными субъекту в сопоставимой дозе. В данных способах также предусмотрено, чтобы введение нескольких последовательных доз фармацевтической композиции, принимаемых с использованием режима для терапевтически эффективных доз, субъекту, нуждающемуся в этом, могло приводить к увеличению промежутка времени между последовательными максимальными значениями, C_{max} , и/или минимальными значениями, C_{min} , уровней композиции в крови по сравнению со случаем введения соответствующих направленно действующих компонентов, не находящихся в виде слитого белка. В упомянутом выше воплощении такое увеличение промежутка времени нахождения между последовательными максимальными значениями, C_{max} , и/или минимальными значениями, C_{min} , может быть по меньшей мере примерно в три раза, или по меньшей мере примерно в четыре раза, или по меньшей мере примерно в пять раз, или по меньшей мере примерно в шесть раз, или по меньшей мере примерно в восемь раз, или по меньшей мере примерно в 10 раз, или по меньшей мере примерно в 20 раз, или по меньшей мере примерно в 40 раз, или по меньшей мере примерно в 50 раз, или по меньшей мере примерно в 100 раз выше по сравнению с введением соответствующего(их) направленно действующего(их) компонента(ов), не находящего(их)ся в виде слитого белка и введенного(ых) в соответствии с сопоставимым режимом введения доз, установленным для направленно действующих компонентов. В описанных выше в этом абзаце воплощениях введение слитого белка или фармацевтической композиции может приводить к улучшению по меньшей мере одного параметра, который, как известно, является полезным для оценки рака или опухоли у субъекта, с использованием более низкой стандартной дозы в молях слитого белка, по сравнению с введением соответствующих направленно действующих компонентов, не находящихся в виде слитого белка и введенных субъекту в сопоставимой стандартной дозе или в соответствии с сопоставимым режимом введения доз.

В одном из воплощений, введение фармацевтической композиции, содержащей заявленную композицию химерного полипептидного комплекса, может приводить к улучшению одного из клинических, биохимических или физиологических параметров, которое превышает таковое, достигаемое посредством введения первой части, не присоединенной ко второй и третьей частям композиции, определяемого с использованием одного и того же анализа или на основании измеренного клинического параметра или конечного показателя. В другом воплощении введение фармацевтической композиции может приводить к улучшению двух или более клинических или относящихся к метаболизму параметров или конечных показателей, каждый из которых опосредуется одной из разнообразных направляющих группировок, что в совокупности приводит к улучшенному эффекту по сравнению со случаем, когда компонент, представляющий собой направляющую группировку, не присоединен к XTEN, определяемому с использованием одного и того же анализа или на основании измеренных клинических параметров. В одном из воплощений введение фармацевтической композиции субъекту приводит к улучшению клинического параметра или конечного показателя, при этом клинический параметр или конечный показатель выбран из одной или любой комбинации из группы, состоящей из уменьшения размеров опухоли в виде полного, частичного или неполного ответа; времени до прогрессирования, времени до констатации отсутствия эффекта лечения, биомаркерной реакции; выживаемости без прогрессирования заболевания; выживаемости без признаков заболевания; времени до возникновения рецидива; времени общей выживаемости; улучшения качества жизни; улучшения симптомов и времени до начала метастазирования. В другом воплощении введение фармацевтической композиции может приводить к улучшению одного или нескольких указанных выше клинических параметров, которое является по меньшей мере на 20% более продолжительным, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100% более продолжительным, чем при действии первой части, не присоединенной ко второй и третьей частям композиции.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способу доставки терапевтического агента к опухолевой клетке. В одном из воплощений изобретения предложен способ доставки терапевтического агента к опухолевой клетке, содержащей опухолеспецифический маркер, способ, включающий введение в клетку-мишень химерного полипептидного комплекса по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, при этом терапевтический агент доставляется в клетку-мишень посредством первого связывающего домена первой части, специфично связывающегося с данным опухолеспецифическим маркером. В одном из воплощений способа опухолеспецифический маркер выбран из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2, B7-H3, B7-H6, CEACAM5, cMET, CTLA4, FOLR1, EpCAM, CCR5, CD19, HER2, HER2 neu, HER3, HER4, HER1 (EGFR), PD-L1, PSMA, CEA, MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG, антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM), CD133, ганглиозида GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1 GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена I плазматических клеток, хондроитин-сульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю

трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирую-

шего вещества Мюллера (MISIR), сialiрированного антигена Tn (sTN), антигена активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухоле-ассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS, CD63, TAG72, антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMPs, антигена F19, альфафетопротеина (AFP), VEGFR1, VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 и EphA2. В другом воплощении способа доставки терапевтического агента к опухолевой клетке, включающего введение в клетку-мишень химерного полипептидного комплекса, этот химерный полипептидный комплекс содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из последовательностей в табл. 12. В другом воплощении способа доставки терапевтического агента к опухолевой клетке, включающего введение в клетку-мишень химерного полипептидного комплекса, этот химерный полипептидный комплекс содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99%, или по меньшей мере 100% идентичность последовательности с полипептидной последовательностью, приведенной на фиг. 36 или 37. В другом воплощении способа доставки терапевтического агента к опухолевой клетке, опухолевая клетка находится в опухоли у субъекта, при этом субъект выбран из группы, состоящей из мыши, крысы, обезьяны, собаки и человека.

V. Нуклеиново-кислотные последовательности по изобретению

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидным последовательностям, кодирующим полипептидные композиции химерного полипептидного комплекса, и последовательностям, комплементарным последовательностям молекул полинуклеотидов, кодирующим полипептидные композиции химерного полипептидного комплекса.

В некоторых воплощениях изобретения предложены полинуклеотиды, кодирующие воплощения композиций химерного полипептидного комплекса, описанные в данном изобретении, или последовательности, комплементарные данной полинуклеотидной последовательности. В других воплощениях изобретения предложены выделенные полинуклеотидные последовательности, кодирующие первую часть, или вторую часть, или третью часть по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, или последовательности, комплементарные данным полинуклеотидным последовательностям. В одном из воплощений изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая химерный полипептидный комплекс в виде слитого белка, состоящего из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в табл. 10 или 12, или последовательности, комплементарная данной полинуклеотидной последовательности. В одном из воплощений изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая композицию химерного полипептидного комплекса, при этом данная полинуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью, приведенной в табл. 10 или 14.

В другом воплощении изобретения предложена выделенная полинуклеотидная последовательность, кодирующая связывающуюся с Т-клеткой композицию, содержащую последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с полинуклеотидной последовательностью, приведенной в табл. 7, или последовательность, комплементарная данной полинуклеотидной последовательности.

Согласно другому аспекту изобретение относится к способам получения полинуклеотидных последовательностей, кодирующих воплощения композиций химерного полипептидного комплекса, или последовательностей, комплементарных данным полинуклеотидным последовательностям, включая их гомологичные варианты, а также способам экспрессии слитых белков, кодируемых данными полинуклеотидными последовательностями. В общем случае, такие способы включают получение полинуклеотидной последовательности, кодирующей компоненты белковой композиции химерного полипептидного комплекса, и экспрессию полученного генного продукта, и сборку нуклеотидов, кодирующих данные компоненты, лигирование компонентов в рамке считывания и встраивание такого кодирующего гена в экспрессирующий вектор, подходящий для клетки-хозяина. Чтобы получить кодируемый слитый белок на основе химерного полипептидного комплекса, способ включает трансформацию соответствующей клетки-хозяина экспрессирующим вектором и культивирование клетки-хозяина в условиях, вызывающих или позволяющих осуществлять экспрессию получающегося слитого белка в трансфицированной клетке-хозяине, с получением тем самым полипептида в виде слитого белка, который выделяют методами, изложенными в данном описании, или стандартными методами очистки белков, известными в данной области техники. Для получения полинуклеотидов и экспрессирующих векторов по настоящему изобретению используют стандартные рекомбинантные методы молекулярной биологии.

В соответствии с данным изобретением, нуклеиново-кислотные последовательности (или комплементарные им последовательности), кодирующие композиции химерного полипептидного комплекса, используют для получения молекул рекомбинантной ДНК, которые направляют экспрессию в соответствующих клетках-хозяевах. Для осуществления настоящего изобретения подходят несколько стратегий клонирования, многие из которых используют для создания конструкции, которая содержит ген, кодирующий композицию по настоящему изобретению, или комплементарную этому гену последовательность. В одном из воплощений стратегию клонирования применяют для создания гена, который кодирует конструкцию химерного полипептидного комплекса, гена, который содержит нуклеотиды, кодирующие химерный полипептидный комплекс, и который используют для трансформации клетки-хозяина с целью экспрессии данной композиции. В упомянутых ранее воплощениях, описанных выше в этом абзаце, гены могут содержать нуклеотиды, кодирующие связывающие группировки, отделяемые сегменты и объемные группировки в конфигурациях, описанных в данном изобретении.

Согласно одному из подходов сначала получают конструкцию, содержащую последовательность ДНК, соответствующую конструкции химерного полипептидного комплекса. Типичные способы получения таких конструкций описаны в разделе Примеры. Затем эту конструкцию используют для создания экспрессирующего вектора, подходящего для трансформации клетки-хозяина, такой как прокариотическая клетка-хозяин, с целью экспрессии и выделения конструкции химерного полипептидного комплекса. Там, где это желательно, клеткой-хозяином является *E.coli*. Типичные способы создания экспрессирующих векторов, трансформации клеток-хозяев и экспрессии и выделения XTEN описаны в разделе примеры.

Ген, кодирующий конструкцию химерного полипептидного комплекса, может быть создан за одну или несколько стадий либо полностью синтетическим путем, либо посредством синтеза, объединенного с ферментативными методами, такими как опосредуемое ферментами рестрикции клонирование, ПЦР и удлинение с перекрыванием, включая способы, более полно описанные в разделе Примеры. Способы, изложенные в данном описании, можно использовать, например, для лигирования последовательностей полинуклеотидов, кодирующих различные компоненты (например, связывающие домены, линкеры, отделяемые сегменты и XTEN), гены желаемой длины и последовательности. Гены, кодирующие композиции химерного полипептидного комплекса, komponуют из олигонуклеотидов с использованием стандартных методов синтеза генов. Конструирование генов может быть выполнено с использованием алгоритмов, в которых оптимизированы частота использования кодонов и состав аминокислот, соответствующий клетке-хозяину *E.coli*, применяемой для продуцирования химерного полипептидного комплекса. Согласно одному из способов по изобретению создают библиотеку полинуклеотидов, кодирующих компоненты таких конструкций, и затем komponуют так, как описано выше. Далее полученные гены komponуют, и эти полученные гены используют для трансформации клетки-хозяина, а также получения и выделения композиций химерного полипептидного комплекса для оценки их свойств, как изложено в данном описании.

Затем полученные полинуклеотиды, кодирующие последовательности химерного полипептидного комплекса, можно клонировать отдельно в экспрессирующий вектор. Нуклеиново-кислотную последовательность встраивают в вектор, используя различные методики. В общем случае, ДНК встраивают в соответствующий(ие) сайт(ы) эндонуклеаз рестрикции, используя методы, известные в данной области техники. Как правило, компоненты векторов включают, но не ограничиваются этим, одну или более чем одну сигнальную последовательность, ориджин репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции. При конструировании подходящих векторов, содержащих один или более чем один из этих компонентов, применяют стандартные методы лигирования, которые известны специалисту в данной области. Такие методы хорошо известны в данной области техники и хорошо описаны в научной и патентной литературе. Общедоступными являются различные векторы. Вектор может быть, например, в форме плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага, которые подходящим образом могут быть подвергнуты методикам рекомбинантной ДНК, и выбор вектора часто будет зависеть от клетки-хозяина, в которую он должен быть введен. Так, вектор может представлять собой автономно реплицирующийся вектор, т.е. вектор, существующий как внехромосомный объект, репликация которого не зависит от репликации хромосомы, например, может представлять собой плазмиду. Альтернативно, вектором может быть такой вектор, который после введения в клетку-хозяина интегрируется в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую(ые) он был интегрирован.

Для регулирования экспрессии полипептида согласно изобретению предложено применение плазмидных экспрессирующих векторов, содержащих реплицируемые и регуляторные последовательности, которые совместимы с клеткой-хозяином и распознаются ею и которые функционально связаны с геном, кодирующим данный полипептид. Обычно такой вектор несет сайт репликации, а также последовательности, кодирующие белки, которые способны обеспечить проведение фенотипического отбора в трансформированных клетках. Такие последовательности в векторах хорошо известны для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Полезные экспрессирующие векторы, которые могут быть использованы, включают, например, сегменты хромосомных, нехромосомных и синтетических последовательностей ДНК. Термин

"экспрессирующий вектор" относится к конструкции на основе ДНК, содержащей последовательность ДНК, которая функционально связана с подходящей регуляторной последовательностью, способной взаимодействовать на экспрессию ДНК, кодирующей полипептид в подходящем хозяине. Необходимо, чтобы векторы были реплицируемыми и стабильными в выбранной клетке-хозяине. При желании можно использовать низко- и высококопийные векторы.

Подходящие векторы включают, но не ограничиваются этим, производные на основе SV40 (обезьяний вирус 40) и pcDNA и известные бактериальные плазмиды, такие как ColE1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, которые описаны в Smith et al., *Gene*, 57: 31-40 (1988), pMB9 и их производные, такие плазмиды, как RP4, фаговые ДНК, такие как многочисленные производные фага I, такие как NM989, а также другие фаговые ДНК, такие как M13 и одноцепочечные ДНК нитчатых фагов; плазмиды дрожжей, такие как 2-х микронная плаزمида или производные 2-х микронной плазмиды, а также содержащие участок центромеры и интегративные дрожжевые челночные векторы; векторы, пригодные для использования в эукариотических клетках, например, векторы, пригодные для использования в клетках насекомых или млекопитающих; векторы, происходящие из комбинации плазмидных и фаговых ДНК, такие как плазмиды, которые были модифицированы для использования фаговой ДНК или регулирующих экспрессию последовательностей, и тому подобное. Системы экспрессии дрожжей, которые также могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, вектор без вставки pYES2 (Invitrogen), вектор со вставкой pYESHisA, B, C (Invitrogen), векторы pRS и тому подобное. Регуляторные последовательности данного вектора включают промотор, необходимый для осуществления транскрипции, возможно последовательность оператора для регуляции такой транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания рибосомы с мРНК, и последовательности, регулирующие терминацию транскрипции и трансляции. Промотором может быть любая последовательность ДНК, которая демонстрирует транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине и может происходить из генов, кодирующих белки, которые являются либо гомологичными, либо гетерологичными белкам клетки-хозяина. Промоторы, подходящие для применения в экспрессирующих векторах с прокариотическими хозяевами, включают системы промоторов Р-лактамазы и лактозы (Chang et al., *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281: 544 (1979)), системы промоторов щелочной фосфатазы и триптофана (trp) (Goeddel, *Nucleic Acid Res.*, 8: 4057 (1980); EP 36776) и гибридные промоторы, такие как tac промотор (deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)), все они функционально связаны с ДНК, кодирующей полипептиды CFXTEN. Промоторы для применения в бактериальных системах также могут содержать последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей полипептиды химерного полипептидного комплекса.

VI. Способы получения композиций по изобретению

Согласно другому аспекту изобретение относится к способам получения композиций химерного полипептидного комплекса с высокими уровнями экспрессии функционального белка при ферментации с использованием *E.coli* в качестве клетки-хозяина, а также способам получения экспрессирующих векторов, кодирующих данные конструкции, полезные для способов получения цитотоксически активных композиций полипептидных конструкций с высокими уровнями экспрессии.

В одном из воплощений способ включает стадии 1) получения полинуклеотида, кодирующего химерный полипептидный комплекс в виде слитого белка по любому из воплощений, описанных в данном изобретении, 2) клонирования данного полинуклеотида в экспрессирующий вектор, который может представлять собой плазмиду или другой вектор, под контролем соответствующих регулирующих транскрипцию и трансляцию последовательностей с целью получения высоких уровней экспрессии белка в биологической системе, 3) трансформации соответствующей клетки-хозяина *E.coli* экспрессирующим вектором и 4) культивирования клетки-хозяина в традиционных питательных средах в условиях, подходящих для экспрессии композиции химерного полипептидного комплекса. Там, где это желательно, клетка-хозяин *E.coli* представляет собой клетку из линии BL21 Gold. Согласно данному способу экспрессия химерного полипептидного комплекса в виде слитого белка приводит к получению при ферментации титров, составляющих по меньшей мере 0,1 г/л, или по меньшей мере 0,2 г/л, или по меньшей мере 0,3 г/л, или по меньшей мере 0,5 г/л, или по меньшей мере 0,6 г/л, или по меньшей мере 0,7 г/л, или по меньшей мере 0,8 г/л, или по меньшей мере 0,9 г/л, или по меньшей мере 1 г/л для экспрессированного слитого белка как компонента неочищенного продукта экспрессии клетки-хозяина, и при этом по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% первого и второго связывающих доменов экспрессированного слитого белка являются правильно свернутыми. Исползованный в данном описании термин "правильно свернутый" означает, что связывающий домен белка обладает способностью специфично связываться со своим целевым лигандом. В другом воплощении изобретения предложен способ получения композиции химерного полипептидного комплекса, включающий культивирование в ферментационной реакционной смеси клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий композиции химерного полипептидного комплекса, в условиях, эффективных для экспрессии полипептидного продукта в концентрации, превышающей примерно 10 миллиграммов/грамм клетки-хозяина по сухому весу (мг/г), или по меньшей мере примерно 250 мг/г, или примерно 300 мг/г, или примерно

350 мг/г, или примерно 400 мг/г, или примерно 450 мг/г, или примерно 500 мг/г, для указанного полипептида, когда ферментационная реакционная среда достигает оптической плотности по меньшей мере 130 единиц при длине волны 600 нм, и при этом первый и второй связывающие домены экспрессированного слитого белка являются правильно свернутыми. В другом воплощении изобретения предложен способ получения композиции химерного полипептидного комплекса, включающий культивирование в ферментационной реакционной смеси клетки-хозяина, которая содержит вектор, кодирующий полипептид, содержащий композиции химерного полипептидного комплекса, в условиях, эффективных для экспрессии полипептидного продукта, в концентрации, превышающей примерно 10 миллиграммов/грамм клетки-хозяина по сухому весу (мг/г), или по меньшей мере примерно 250 мг/г, или примерно 300 мг/г, или примерно 350 мг/г, или примерно 400 мг/г, или примерно 450 мг/г, или примерно 500 мг/г, для указанного полипептида, когда ферментационная реакционная среда достигает оптической плотности по меньшей мере 130 единиц при длине волны 600 нм, и при этом экспрессированный полипептид продукт является растворимым.

Далее приведены примеры композиций, способов и схем лечения по изобретению. Очевидно, что на практике могут быть осуществлены различные другие воплощения с учетом приведенного выше общего описания.

Примеры

Пример 1. Создание конструкции ProTIA, содержащей анти-EpCAM-анти-CD3-XTEN с отделяемым сегментом и XTEN.

Ген, кодирующий тандемный анти-EpCAM-анти-CD3 scFv, за которым следует одна из мультиспецифичных последовательностей отделяемого сегмента (BSRS-1, аминокислотная последовательность LSGRSDNHSPGLAGS), синтезировали в Genescript, при этом введенные сайты рестрикции NdeI и BsaI совместимы с сайтами NdeI и BsaI в принимающем векторе pBR322-XTEN864. Фрагменты расщепленного рестриктазами гена, содержащие тандемный анти-EpCAM-анти-CD3 scFv и BSRS-1, лигировали в вектор pBR322-XTEN864, используя T4 ДНК-лигазу, и использовали для трансформации клеток линии BL21 Gold (New England Biolabs). Проводили скрининг трансформантов, используя набор DNA MiniPrep, и последовательность желаемой конструкции подтверждали секвенированием ДНК. Полученный в итоге вектор содержит последовательность, кодирующую молекулу ProTIA, содержащую компоненты (в направлении от N- к C-концу) биспецифичного тандемного анти-EpCAM-анти-CD3 scFv вместе с BSRS-1 в качестве отделяемого сегмента, слитую с геном XTEN_864 под контролем промотора PhoA (щелочная фосфатаза) и с сигнальной последовательностью STII (термостабильный энтеротоксин II). Полученная конструкция обозначается как AC1278, при этом соответствующая ей последовательность ДНК и кодируемая аминокислотная последовательность представлены в табл. 10.

Другую конструкцию анти-EpCAM-анти-CD3-XTEN с отделяемым сегментом, обозначенную как AC1476, вместе с последовательностью ДНК и кодируемой аминокислотной последовательностью, также представленными в табл. 10, конструировали аналогичным образом в векторе pYS0044-XTEN864-H6 в качестве базового вектора.

Подчеркнутая последовательность представляет собой сигнальный пептид, который отщепляется в процессе секреции и отсутствует в конечном зрелом белке.

Последовательность ДНК и аминокислотная последовательность конструкций
AC1278 и AC1476 анти-ЕрСАМ-анти-CD3-ХТЕН с отделяемым сегментом

Название конст-рукции	Последовательность ДНК	Аминокислотная последовательность*
AC1278	ATGAAGAAAAACATCGCTTTTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTT TTCTATTGCTACAAACGCGTACGCTCATCACCACCATCATCACC ATCAGCAACTGGTTATGACCCAAAGCCGAGCAGCCTGACCGTT ACCGCGGGCGAAAAGGTTACCATGAGCTGCAAAAGCAGCCAAAG CCTGCTGAACAGCGCGCAACCAAAAGAACTACCTGACCTGGTACC AACAGAAGCCGGGTGAGCGCCGAAACTGCTGATCTACTGGGCG AGCACCCTGAGAGCGGCGTTCCGGACCGTTTTACCGGCAGCGG CAGCGGTACCGACTTTACCTTGACCATTAGCAGCGTGCAGGCGG AAGATCTGGCGGTGTACTATTGCCAAAACGACTACAGCTACCCG CTGACCTTTGGTGCGGGCACCAACTGGAGATCAAGGTTGGCGG TGGCAGCGGCGGTGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGCAGCGAGGTTT AGCTGCTGGAACAGAGCGGCGGAGCTGGTGCCTCCGGGTACC AGCGTTAAGATCAGCTGCAAGGCGAGCGGTATGCGTTACCAA CТАCTGGCTGGGTTGGGTGAAGCAACGTCGGGTACCGTCTGG AGTGGATCGGCGACATTTCCCGGGCAGCGGTAACTCCACTAC AACGAGAAATTCAAGGGTAAAGCGACCTGACCGCGGATAAAAG CAGCAGCACCGCGTATATGAGCTGAGCAGCCTGACCTTCCAAG ATAGCGCGGTTTACTTCTGCGCGCGTCTGCGTAACTGGGATGAA CCGATGGATTACTGGGGTCAGGCGACACCGTGACCGTTAGCAG CGGTGGTGGCGGCGAGCATGTTTCACTGGTCAAAAGCGGTGCGG AAGTGAAAAAGCCGGGTGCGAGCGTGAAAGTTAGCTGCAAGCG AGCGGCTATACCTTACCCGTTACACCATGCATGGGTTCGTCA GGCGCCGGGTGAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAACCCGA GCCGTGGCTATACCAACTACGCGGATAGCGTGAAAGGTCTGTTT ACCATTACACCGACAAAAGCAGCAGCAGCGGTACATGGAAC GAGCAGCTGCGTAGCGAGGATACCGCGACCTACTATTGCGCGC GTTACTATGATGACCACTACTGCCTGGACTATTGGGGCCAAGGT ACCACCGTTACCGTGAGCAGCGGTGAAGGCAGCAGCAGCGGAG CGGTGGTAGCGGTGGTAGCGGCGGTGCGGATGACATCGTTCTGA CCCAAAGCCCGCGACCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAGCGTGCG ACCCTGAGCTGCCGTGCGAGCCAGAGCGTTAGCTACATGAACTG GTACCAGCAAAAGCCGGGCAAGCGCCGAGCGTTGGATTATG ATACCAGCAAGGTTGCGAGCGGTGTTCCGGCGCGTTTCAGCGGT AGCGGTAGCGGCACCGATTATAGCCTGACCATTAACAGCCTGGA GCGGGAAGATGCGGCGACCTACTACTGCCAACATGGAGCAGCA ATCCGCTGACCTTCGCTGGTGGTACCAGGTTGAAATTAAGGGC ACCGCCAAGCAGCTAGCGCCTCTGGCCTGTCAGGTCGTTCTGA TAACCATTCCTCACTGGGTCTGGCTGGGTCTCCAGGTAGCCAG CTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAATCCGCT ACTCCAGAATCCGCTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGG TTCTGCTCCAGGCTCCCGGCGAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAG AGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACC TCCACTGAACCGTCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTACTTCCGAAAG	MKKNIAFLASMFVFSI ATNAYAHNNHHHHHELV MTQSPSSSLTVTAGEKVT MSCKSSQSLNLSGNQKN YLTWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVFDRFTGS GSGTDFTLTISVVQAE LAVYYCQNDYSYPLTFG AGTKLEIKGGGGSGGGG SGGGGSEVQLLEQSGAE LVRPGTSVKISCKASGY AFTNYWLGWVKRPGHG LEWIGDIFPGSGNHNHYN EKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSTLFEDSAVYF CARLRNWFDEPMDYWGQG TTVTVSSGGGGSDVQLV QSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTRYTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSRG YTNYSADSVKGRFTITTD KSTSTAYMELSSLSRSED TATYYCARYYDDHYCLD YWGQGTFTVTVSSGEGTS TSGSGSGSGSGGADDIVL TQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSYMNWYQQK PGKAPKRWIYDTSKVAS GVPARFSGSGSGTDYSL TINSLEAEDAATYYCQQ WSSNPLTFGGGTKEVIK GTAEAAASASGLSGRSDN HSPLGLAGSPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEG

CGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTCTCTGAGCCTGCTACTTCCG GCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCTGAA ACTCCAGGTTACCCGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGG TACCTCTGAGTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCA CCGAGCCGAGCGAGGGTTACGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCG TCCGAGGGTAGCGCACCCGGTTCTCCGGCGGGTCCCTTACGTC TACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCGAGGGCAGCGCGC CAGGCACCAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGACCTGGCACT AGCGAATCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGA ACCAAGCGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCC CAGAATCTGGCCCCGGTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAA ACCCCGAGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTAGCGCTCCTGG CACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCTGGTACGTCTG AAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGGCCAGGCACCTCTGAAAGCGCT ACTCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTC CACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTC CTGGCTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACC TCGGAATCTGCGACTCCGGGAATCTGGCCCGGGCAGGACACGGA GCCGTCTGAGGGTAGCGCACCCAGGTACCAGCACTGAGCCTTCTG AGGGCTCTGCACCGGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCT GCGCCGGGTACTTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTACGACACAGG TACTAGCACGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAAGTACGAGCA CCGAACCGTCGGAGGGTAGCGTCCAGGTAGCCACGCGGGCTCT CCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCCAGCACCGAGCCGTCCGAAGG TTCCGCACCCAGGTACAAGCGAGAGCGGACTCCTGAATCTGGTC CGGGTAGCGAGCCTGCAACCCAGCGGTTCTGAGACCGCGGGCACT TCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTACGAGCCGGC GACGAGCGGTTCCGAAACCGGGGTACGTCTGAATCAGCCACGC CGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCG GCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAAGCGGTCCGGG CAGCCCGGCAGGTTCTCAACCCAGCACCGAAGAAGGTTCCCTG CTGGTAGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCC CCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAG AAGCGGTCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCAC CAGGCACCTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCT GAACCAAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCACTTCTGAGTC CGCAACCGCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAACCAAGTACTTCCG GCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCT GGTCTTGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAAG TTCTCCGGCTGGTAGCCCGACCAAGCACGGAGGAGGGTACGTCTG AATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCAGGTTCCGAGCCTGCAACG TCTGGCAGCGAAACCCCGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGA AAGCGGTCTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTACCGAGG AGGGTTCACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACT AGCACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAG CGCAACGCCAGAGAGCGGTCCAGGCACCAAGCAATCGGCCACCC CTGAGAGCGGCCAGGTACTTCTGAGAGCGCCACTCCTGAATCC GGCCCTGGTAGCGAGCCGGAACCTCCGGCTCAGAACTCCTGG TTCGGAACCAAGCGACCAAGCGGTTCTGAAACTCCGGGTAGCCCGG CAGGCAGCCCAACGAGCACCGAAGAGGGTACCAGCACGGAACCG AGCGAGGGTTCTGCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGG CTCTGCACCTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGC CGGGTACCAGCGAAAGCGCTACCCAGAAATCCGGTCCGGGCACT	SAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPSTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPST ESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEPSEGSAP PTSTEESGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPSTST EPSEGSAPGTSESATPE SGPSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPT STEESGSPAGSPTSTE TSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTE STEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSET GTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPG
---	--

	AGCACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGCACCAGGT	
AC1476	ATGAAGAAAAACATCGCTTTTCTTCTTGCATCTATGTTCTGTTTT TTCTATTGCTACAAACGCGTAGCGTGATATTCAGATGACCCAAT CGCCGTGTCCTGTCAGCTTCAGTCGGTGATCGTGTTACCATT ACCTGTCGCTCAACGAAATCCCTGCTGCATTCAAACGGTATTAC CTATCTGTACTGGTATCAGCAAAACCGGGCAAAGCGCCGAAAC TGGTGATCTACCAGATGTGCAATCTGGCCAGCGGTGTTCCGTCT CGTTTTAGCTCTAGTGGTTCTGGCACCATTTCACCTGACGAT TTCCCTCACTGCAACCGGAAGACTTTGCAACGTATTACTGCGCTC AGAACCTGGAAATCCCGCTACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTC GAAATTAAGGTGCAACGCCTCCGGAGACTGGTGCTGAAACTGA GTCCCGGGCGAGACGACCGGTGGCTCTGCTGAATCCGAACCAC CGGGCGAAGGCCAAGTGCAACTGGTTTCAGAGCGGTCCGGGTCTG GTCCAACCGGGTGGCAGTGTGCGTATTTCTGCGCGGCCTCAGG TTACACCTTTACGAACATATGGCATGAATTGGGTGAAACAGGCC CGGGTAAAGGCCCTGGAATGGATGGGTGGATCAACACCTACACG GGCGAATCTACCTATGTCAGATAGTTTCAAAGGCCGCTTTACCTT CAGCCTGGACACGCTGCTAGTGCAGCTTATCTGCAGATTAATA GCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGTTTATTACTGTGCGCGCTTT GCAATCAAAGGCGACTACTGGGGCCAAGGCACCTGCTGACCGT GTCTCCGGTGGTGGCGGCAGCGACATCCAAATGACCCAGAGCC CGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTACCATCACC TGCCGTGCGAGCCAAGACATCCGTAACCTACCTGAACCTGGTATCA GCAAAGCCGGGTAAAGCGCCGAAGCTGCTGATCTACTATACCA GCCGTCTGGAGAGCGGCGTGCCGAGCCGTTTCAGCGGTAGCGGT AGCGGTACCGACTACACCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGA AGATTTGCGGACCTACTATTGCCAGCAGGGTAACACCTGCCGT GGACCTTTGGTCAAGGCACCAAAGTTGAGATTAAGGCGCCACG CCTCCGGAACCTGGTGCTGAGACGGAATCCCTCGGTGAAACCAC TGGCGGTTCTGCCGAATCTGAACCGCCTGGTGAAGGCGAGGTGC AGCTGGTTGAAGCGGTGGCGGTCTGGTGCAACCAGGCGGTAGC CTGCGTCTGAGCTGCGCGCGAGCGGTTACAGCTTTACCGGTTA TACCATGAACCTGGGTTCGTCAAGCGCCAGGTAAGGTCTGGAGT GGGTGGCGCTGATCAACCCGTACAAGGTGTTAGCACCTATAAC CAGAAGTTCAAAGACCGTTTTACCATTAGCGTGGATAAGAGCAA AAACACCGCGTACCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACA CCGCTGTGTACTATTGCGCGCTAGCGGTTACTATGGCGACAGC GACTGGTATTTTGATGTGTGGGGCCAAGGCACCTGGTTACCGT GAGCTCCGGCACCGCCGAAGCAGCTAGCGCCTCTGGCCTGTCAG GTCGTTCTGATAAACCATTTCCCACTGGGTCTGGCTGGGTCTCCA GGTAGCCAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTC TGAATCCGCTACTCCAGAATCCGGTCTCTGGTACTAGCACTGAGC CAAGCGAAGGTTCTGCTCCAGGCTCCCGGCGAGGTAGCCCTACC TCTACCGAAGAGGGCACTAGCACCGAACCATCTGAGGGTTCCGC TCCTGGCACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCAGTGCTCCGGGTA CTTCGGAAGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAGCCT GCTACTTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTC TGGTTCTGAAACTCCAGGTTACCGGCGGGTAGCCCGACGAGCA CGGAGGAAGGTACCTCTGAGTCGGCCACTCCTGAGTCCGGTCCG GGCACGAGCACCGAGCCGAGCGAGGGTTCAGCCCCGGGTACAG CACGGAGCCGTCGAGGGTAGCGCACCGGGTTCCTCCGGCGGGCT CCCCTACGCTACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCGAG GGCAGCGCGCCAGGCACGAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGC	MKKNIAFLLASMFVFSI ATNAYADIQMTQSPSSL SASVGDVRVITCRSTKS LLHSNGITYLYWYQKPK GKAPKLLIYQMSNLASG VPSRFSSSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCAQN LEIPRTFGQGTKEIKG ATPPETGAETESPGETT GGSASEPPEGGQVQLV QSGPGLVQPGGSVRISC AASGYTFNTYGMNVVKQ APKGLEWMGWINTYTG ESTYADSFKGRFTFSLD TSASAAYLQINSLRAED TAVYYCARFAIKGDYWG QGTLTLVSSGGGSDI MTQSPSSLSASVGDVRV ITCRASQDIRNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYYSRL ESGVPSRFSGSGSGTDY TLTISSLQPEDFATYYC QQGNLTPWTFGQGTKE IKGATPPETGAETESPG ETGGSASEPPEGGEV QLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGYSTGYTMNW VRQAPKGLEWVALINP YKGVSTYNQKFKDRFTI SVDKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARSGYYGD SDWYFDVWVGQGLVTVS SGTAEASASGLSGRSD NHSPLGLAGSPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPA TS GSETPGSEPA TS GS PAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPG TS SESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESG PGSEPA TS SGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGP

ACCTGGCACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTA CGAGCACGGAACCAAGCGAAGGCAGCGCCAGGTACCTCTGAA TCTGCTACCCAGAAATCTGGCCCGGGTCCGAGCCAGCTACCTC TGGTTCTGAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCAAGCGAAGGTA GCGCTCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCCT GGTACGCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCAGGCACCTC TGAAGCGCTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTT CTCCAACCTCCACTGAAGAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCT GAATCTGGTCCGGTCCGAACCTGCTACCTCTGGTTCGAAAC TCCAGGTACCTCGAATCTGCGACTCCGGAATCTGGCCCGGCA CGAGCACGGAGCCGTCTGAGGGTAGCGACCCAGGTACCAGCACT GAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACCGGTACCTCCACGGAACCTTC GGAAGGTTCTGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTT CAGCACCGGTAAGTACGACGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCA GGTACGAGCACGGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCCC AGCGGGCTCTCCGACAAGCACCGAAGAGGCACCGACCGAGC CGTCCGAAGGTTCCGACCCAGGTACAAGCGAGAGCGCGACTCCT GAATCTGGTCCGGTAGCGAGCTGCAACCGAGCGTTCTGAGAC GCCGGGCACTTCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTT CAGAGCCGGGACGAGCGGTTCGGAACCGCCGGGTACGTCTGAA TCAGCCACGCGGAGTCTGGTCCGGGTACCTCCAGCAACCAAG CGAAGGTTCCGACCCGGTACTAGCGAGAGCGCAACCCCTGAAA GCGGTCCGGGACGCCCGGAGGTTCTCAACCGACCGCAAGAA GGTTCCTGCTGGTAGCCGACCTCTACGAGGAAGGTAGCCC TGCAGGTTCCCAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCG CTACCCAGAAAGCGGTCTGGTACCTCCACTGAACCGTCTGAA GGTTCCTGCAACGAGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAGCG CCCAGGTTCTGAACCGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGCA CTTCTGAGTCCGCAACCGCTGAATCCGGTCTGGTCTGAACCA GCTACTTCCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGAC TCCAGAGTCTGGTCTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTT CCGCAACCGGTTCTCCGGTGGTAGCCCGACCGACCGGAGGAG GGTAGCTCTGAATCTGCAACCGCGAATCGGGCCAGGTTCCGA GCCTGCAACGCTCTGGCAGCGAAACCCCGGTACCTCCGAATCTG CTACCCGGAAGCGGTCTGGCAGCCCTGCTGGTCTTCCAAAC TCTACCGAGGAGGTTTACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGA AGAAGGTACTAGCACGGAGCCGAGCGAGGTTAGTCTCCGGGTA CGAGCGAGAGCGCAACCGCAGAGCGGTCCAGGCACCGCGAA TCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCAGGTACTTCTGAGAGCGCCAC TCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGCAACCTCCGGCTCAG AAACTCCTGGTTCGGAACCGAGCGACCGGTTCTGAAACTCCG GGTAGCCCGGCGAGCGACCCCAACGACCGCAAGAGGTTACAG CACGGAACCGAGCGAGGGTTCTGCCCCGGTACTTCCACCGAAC CATCGGAGGGCTCTGCACTGGTAGCGAACCTGCGACGTCTGGT TCTGAAACCGCGGTACCGAGCGAAAGCGCTACCCAGAAATCCGG TCCGGGCACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGACCGAGGTC ACCATCATCACCATCAC	GSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEATPE SGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGHHHHHHH
--	--

* Подчеркнутый пептид представляет собой сигнальный пептид.

Пример 2. Получение нерасщепленной и расщепленной конструкции His8-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864 из ферментируемой культуры E.coli.

1) Экспрессия и очистка конструкции His8-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864 из ферментируемой культуры E.coli.

Слитый белок AC1278 (MKKNIAFLASMFVFSIATNAYA-His(8)-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN_AE864) экспрессировали в запатентованном Amunix штамме E.coli AmE098. Ферментируемую культуру в объеме 10 л растили при 37°C, и температуру понижали до 26°C после прекращения подпитки солями. В процессе сбора ферментационный бульон целиком центрифугировали для осаждения клеток. Супернатант собирали и далее использовали флокуляцию под действием кислоты для уменьшения содержания эндотоксина и примесей белков клетки-хозяина. Используя 1 М раствор уксусной кислоты, pH супернатанта постепенно уменьшали до значения 4,5 и супернатант оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем pH обратно повышали до значения 7,5, используя 2 М раствор NaOH, и супернатант выдерживали в течение ночи при 4°C. На следующий день супернатант фильтровали, используя фильтровальную ячейку 3M LifeAssure с размером пор 0,20 мкм.

Чтобы убедиться в целостности N-конца с аффинной His-меткой, в качестве первой стадии использовали стадию с аффинной хроматографией с захватом на колонке с иммобилизованным металлом. В пять корпусов колонок RedisepRf 25G емкостью по 10 мл (Teledyne Isco) упаковывали по 10 мл смолы ToyoPearl-AF-Chelate 650M (TOSOH Biosciences). Содержимое колонок дезинфицировали 0,5 М раствором NaOH, тщательно промывали дистиллированной водой, затем вносили 0,1 М раствор Ni₂SO₄ и уравнивали уравнивающим буфером (20 мМ трис, 250 мМ NaCl, pH 7,5) в количестве 5 объемов колонки (CV). Ввиду того, что точка помутнения тритона X-114 составляет 23°C, тритон-содержащий буфер для промывки (20 мМ трис, 100 мМ NaCl, 0,1% тритона X-114, pH 7,5) и буфер для 2-й промывки (20 мМ Трис, 100 мМ NaCl, pH 7,5) готовили заранее, хранили при 4°C и выдерживали на льду в процессе применения. По окончании уравнивания колонки в колонку загружали супернатант. После пропускания в количестве 3 CV уравнивающего буфера в качестве вытеснителя колонку промывали холодным тритон-содержащим буфером для промывки в количестве 10 CV с целью уменьшения содержания эндотоксина, затем холодным буфером для 2-й промывки в количестве 10 CV с целью удаления

трилона X-114. Затем белок элюировали с колонки элюирующим буфером (20 мМ трис, 100 мМ NaCl, 150 мМ имидазол, pH 7,5) в количестве 3 CV и собирали фракции в объеме 1 CV (10 мл). Чтобы уменьшить окисление белка, при каждом элюировании в буфер добавляли 5 мМ EDTA. Фракции, соответствующие загрузке, проскоку (FT) и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях в 4-12%-ом бис-трис-геле и окрашивания кумасси. На основании представленных на геле результатов фракции, элюированные в CV1 и CV2, сохраняли для дальнейшей обработки (фиг. 14A).

В качестве последующей стадии тонкой очистки была выбрана стадия с гидрофобной хроматографией (HIC). В два корпуса колонок Rediseprf 25G емкостью по 20 мл (Teledyne Isco) упаковывали по 20 мл смолы Toyopearl-Phenyl-650M (TOSOH Biosciences). Содержимое колонок дезинфицировали 0,5 М раствором NaOH, тщательно промывали дистиллированной водой и уравнивали буфером А (20 мМ трис, 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5) в количестве 5 CV. Элюирующие буферы, содержащие 75% буфера А, 50% буфера А и 25% буфера А, готовили заранее путем смешивания соответствующих объемов буфера А и буфера В (20 мМ трис, pH 7,5). Фракции, элюированные при проведении IMAC в CV 1 и 2 с колонок на предыдущей стадии, объединяли вместе и добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1 М, после чего загружали в предварительно уравнированные фенильные колонки. После загрузки и вытеснения буфером А в количестве 3 CV вещество с колонки элюировали буферами, содержащими 75% буфера А, 50% буфера А, 25% буфера А и 0% буфера А в количестве 3 CV каждого. Фракции, соответствующие загрузке, проскоку и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях в 4-12%-ом бис-трис геле и окрашивания кумасси. На основании представленных на геле результатов фракции, элюированные в CV 1-2 при пропускании 750 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (заклученные в рамку), объединяли для дальнейшей обработки (фиг. 14B).

Чтобы убедиться в целостности С-концевой части XTEN и для дальнейшего уменьшения содержания эндотоксина, в качестве заключительной стадии тонкой очистки была выбрана стадия с анионообменной хроматографией. В корпус колонки XK16 системы AKTApurifier упаковывали 5 мл смолы Carro Q Impress (GE Healthcare), содержимое дезинфицировали 0,5 М раствором NaOH, тщательно промывали дистиллированной водой, отмывали буфером В (20 мМ трис, 500 мМ NaCl, pH 7,5) в количестве 2 CV и уравнивали буфером А (20 мМ трис, pH 7,5) в количестве 5 CV. Объединенные фракции, элюированные при проведении HIC, разбавляли в 4 раза, после чего наносили на колонку. Затем колонку промывали 30%-ным буфером В в количестве 3 CV и элюировали, используя градиент от 30 до 70% буфера В в количестве 15 CV. В ходе элюирования собирали фракции объемом $\frac{1}{2}$ CV (по 2,5 мл). Фракции, соответствующие загрузке, проскоку и элюированию, далее анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях и окрашивания кумасси для определения фракций с целью их объединения для приготовления (фиг. 14C).

2) Приготовление и определение характеристик.

Желаемые элюированные фракции (заклученные в рамку на фиг. 14C) концентрировали и проводили замену буфера на 50 мМ трис, 150 мМ NaCl, pH 7,5. Приготовленный продукт подвергали стерильному фильтрованию (0,2 мкм). Для выпущенной партии с целью определения качества продукта использовали анализ посредством гель-проникающей хроматографии и SDS-PAGE анализ. Для проведения анализа посредством SEC в аналитическую колонку для SEC вводили 10 мкг приготовленного продукта, подтверждая содержание продукта более 95% в виде мономера (фиг. 15A). SDS-PAGE анализ проводили, нанося 5 мкг приготовленного продукта на 4-12%-ный бис-трис гель и окрашивая кумасси синим. Чистота продукта превышала 90% (фиг. 15B).

3) Активация и хранение фермента.

Рекомбинантная мышьяная MMP-9 поступала от R&D Systems в виде зимогена, и для ее активации требовалась обработка 4-аминофенилацетатом ртути (APMA). APMA сначала растворяли в 0,1 М растворе NaOH до конечной концентрации 10 мМ, после чего pH подвели до нейтрального значения, используя 0,1н. раствор HCl. Дальнейшее разбавление исходного раствора APMA до концентрации 2,5 мМ выполняли в 50 мМ трис-буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 10 мМ CaCl_2 , pH 7,5. Чтобы активировать про-MMP, инкубировали 1 мМ APMA и про-MMP-9 в концентрации 100 мкг/мл при 37°C в течение 3 ч. Активированный фермент с добавленным до конечной концентрации 50% глицерином затем можно хранить при -20°C в течение нескольких недель.

4) Расщепление His(8)-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864 под действием MMP-9.

Чтобы получить отщепленный фрагмент ProTIA-A aEpCAM-aCD3, 9,12 мг приготовленного продукта His(8)-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864 (ProTIA-X) инкубировали в течение 2 ч при 37°C в реакционной смеси, содержащей 10 мМ CaCl_2 и активную рекомбинантную мышьяную MMP-9 (R&D Systems) в молярном соотношении фермента к субстрату 1:2237. Чтобы подтвердить специфичность расщепления в BSRS1, 5 мкг нерасщепленного и расщепленного под действием MMP-9 продукта анализировали с использованием SDS-PAGE на 4-12%-ом бис-трис-геле с последующим окрашиванием кумасси синим. Применение окрашивания кумасси синим позволяло визуализировать полноразмерный продукт His8-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864 (ProTIA-X) до расщепления под действием MMP-9 и отщепленный фрагмент His8-aEpCAM-aCD3 (ProTIA-A) после расщепления под действием MMP-9 (фиг. 16A).

5) Очистка отщепленного фрагмента His(8)-aEpCAM-aCD3, ProTIA-A, после расщепления под действием MMP-9.

После подтверждения факта расщепления под действием MMP-9 в BSRS1, для удаления MMP-9 использовали аффинную хроматографию на колонке с иммобилизованным металлом. В полипропиленовый корпус колонки емкостью 5 мл (ThermoScientific) упаковывали 2 мл смолы ToyoPearl-AF-Chelate 650M (TOSOH Biosciences). Колонку уравнивали уравнивающим буфером (20 mM трис, 250 mM NaCl, pH 7,5) в количестве 5 CV. Затем подвергнутую расщеплению смесь загружали в колонку. После загрузки и вытеснения уравнивающим буфером в количестве 1 CV колонку промывали уравнивающим буфером в количестве 3 CV. Белок элюировали с колонки элюирующим буфером (20 mM трис, 100 mM NaCl, 150 mM имидазол, pH 7,5) в количестве 3 CV и собирали фракции по 1 CV (2 мл). Фракции, соответствующие загрузке, проскоку и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях в 4-12%-ом бис-трис-геле и окрашивания кумасси для определения элюированных фракций, содержащих ProTIA-A (фиг. 16B).

6) Приготовление и определение характеристик отщепленного фрагмента His(8)-aEpCAM-aCD3.

Желаемые элюированные фракции (заклученные в рамку на фиг. 16B) концентрировали и проводили замену буфера на 50 mM трис, 150 mM NaCl, pH 7,5. Для выпущенной партии с целью определения качества продукта использовали анализ посредством геле-проникающей хроматографии и SDS-PAGE анализ. Для проведения анализа посредством SEC в аналитическую колонку для SEC вводили 10 мкг продукта, подтверждая содержание продукта более 95% в виде мономера (фиг. 17A). Для проведения SDS-PAGE анализа на 4-12%-ный бис-трис-гель наносили 5 мкг продукта, подтверждая наличие продукта с чистотой более 90%. Чистота продукта превышала 90% (фиг. 17B).

Пример 3. Получение нерасщепленной и расщепленной конструкции AC1476, aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN AE864-His(6), из ферментируемой культуры E.coli.

1) Экспрессия и очистка конструкции AC1476, aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN_AE864-His(6), из ферментируемой культуры E.coli.

Слитый белок AC1476 (MKKNIAFLASMFVFSIATNAYA-aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN_AE864-His(6)) экспрессировали в запатентованном Amunix штамме E.coli AmE098. Ферментируемую культуру в объеме 10 л растили при 37°C и температуру смешали до 28°C после прекращения подпитки солями. В процессе сбора ферментационный бульон целиком центрифугировали для осаждения клеток. Супернатант фильтровали, используя фильтровальную ячейку 3M LifeAssure с размером пор 0,20 мкм. В корпус колонки XK50 упаковывали 100 мл смолы ToyoPearl-AF-Chelate-650M (TOSOH Biosciences) и колонку присоединяли к перистальтическому насосу при 4°C. Содержимое колонки дезинфицировали 0,5 M раствором NaOH, тщательно промывали дистиллированной водой, заполняли 0,1 M раствором Ni₂SO₄ и уравнивали уравнивающим буфером (20 mM трис, 250 mM NaCl, pH 7,5) в количестве 5 CV. По окончании уравнивания колонки в колонку загружали супернатант, затем выполняли промывку тритон-содержащим буфером, 2-ю промывку и элюирование способом, аналогичным описанному выше в примере 2-1. Элюированные фракции собирали в объеме 1/4 CV (25 мл) и добавляли EDTA до конечной концентрации 5 mM с целью хелатирования свободных ионов никеля. Фракции, соответствующие загрузке, проскоку и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях в 4-12%-ом бис-трис-геле и окрашивания кумасси. На основании представленных на геле результатов элюированные фракции 2-5 (заклученные в рамку) сохраняли для дальнейшей обработки (фиг. 18A).

В качестве последующей стадии тонкой очистки была выбрана стадия с гидрофобной хроматографией (HIC). В корпус колонки XK24 системы AKTApurifier упаковывали 50 мл смолы Toyopearl-Phenyl-650M (TOSOH Biosciences). Содержимое колонок дезинфицировали 0,5 M раствором NaOH, тщательно промывали дистиллированной водой и уравнивали буфером A (20 mM трис, 1 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,5) в количестве 5 CV. Желаемые фракции, элюированные с колонки при проведении IMAC на предыдущей стадии, объединяли вместе и добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1 M, после чего загружали в колонку. Элюированные фракции собирали в объеме 1/2 CV (25 мл), применяя для элюирования градиент от 100% до 50% буфера A в количестве 10 CV. Фракции, соответствующие загрузке, проскоку и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях в 4-12%-ом бис-трис-геле и окрашивания кумасси. На основании представленных на геле результатов фракции, элюированные фракции, заклученные в рамку, объединяли для дальнейшей обработки (фиг. 18B).

В качестве заключительной стадии тонкой очистки была выбрана стадия с анионообменной хроматографией. В корпус колонки XK24 упаковывали 30 мл смолы Capto Q Impress (GE Healthcare), содержимое дезинфицировали 0,5 M раствором NaOH, тщательно промывали дистиллированной водой, отмывали буфером B (20 mM трис, 500 mM NaCl, pH 7,5) в количестве 2 CV и уравнивали буфером A (20 mM трис, pH 7,5) в количестве 5 CV. В объединенных элюированных фракциях проводили замену буфера, используя модуль для ультрафильтрации Pellicon XL с мембраной Biomax (10 кДа), на 20 mM трис, pH 7,5, до тех пор, пока удельная электропроводность пермеата не составляла 8 мСм/см (миллисиemens/см). Пермеат загружали в колонку Capto Q Impress и колонку затем промывали 10%-ным и 20%-ным буфером B в количестве 3 CV. Элюированные фракции собирали в объеме 1/4 CV (7,5 мл), применяя для элюирования градиент от 20% до 70% буфера B в количестве 10 CV. Фракции, соответствующие за-

грузке, проскоку и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях в 4-12%-ом бис-трис-геле и окрашивания кумасси. На основании представленных на геле результатов отобранные элюированные фракции (заклученные в рамку) объединяли для приготовления (фиг. 18C).

2) Приготовление и определение характеристик конструкции aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864-His(6).

Желаемые элюированные фракции концентрировали и проводили замену буфера на 50 mM трис, 150 mM NaCl, pH 7,5. Для выпущенной партии с целью определения качества продукта использовали протокол, установленный в примере 2 для анализа посредством SEC (фиг. 19A) и SDS-PAGE (фиг. 19B). В дополнение к этому, на 4-12%-ный бис-трис-гель загружали по 2 мкг образцов для проведения SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях с последующим окрашиванием серебром (фиг. 19C). Помимо этого, результаты SEC использовали для определения кажущейся молекулярной массы и фактора кажущейся молекулярной массы (относительно фактической молекулярной массы), а также гидродинамического радиуса aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864-His(6). Измеренное значение кажущейся молекулярной массы составляло 1,7 МДа, из чего следует значение фактора кажущейся молекулярной массы 12,3 и рассчитанное значение гидродинамического радиуса 10,8 нм.

Для дальнейшей идентификации данной молекулы использовали метод масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS), и экспериментально определенное значение массы составляло 138652 Да, при этом А_{масс} (отклонение от среднего значения массы) составляло +1 Да по сравнению с теоретически рассчитанной молекулярной массой 138651 Да (фиг. 20A). При проведении аналитической катионообменной хроматографии 10 мкг образца загружали в колонку Bio SCX (сильный катионообменник) NP3 от Agilent с использованием 20 mM ацетата натрия, pH 4,5, в качестве подвижной фазы А и 20 mM ацетата натрия, содержащего 1 M хлорид натрия, pH 4,5, в качестве подвижной фазы В. В ходе разделения применяли линейный градиент 0-100% В в течение 20 мин и регистрировали только один отдельный основной пик (фиг. 20B).

4) Расщепление aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864-His(6) под действием MMP-9.

Следуя описанному в примере 2 протоколу активации MMP-9 и расщепления, проводили расщепление 20 мг конструкции aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864-His(6) (ProTIA-X), однако при этом для активной рекомбинантной мышины MMP-9 использовали молярное соотношение фермента к субстрату, составляющее только 1:6000. Нерасщепленный и расщепленный продукты анализировали посредством SDS-PAGE (фиг. 21A).

5) Очистка расщепленного aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN864-His(6) после расщепления под действием MMP-9.

После подтверждения факта расщепления под действием MMP-9 в BSRS1, для удаления отщепленного свободного XTEN и нерасщепленного ProTIA-X использовали анионообменную хроматографию. В два полипропиленовых корпуса колонок емкостью по 5 мл (ThermoScientific) упаковывали смолу Macro-Car Q (GE Healthcare) по 3 мл в каждый, содержимое дезинфицировали в режиме CIP (промыка на месте) (0,5 M раствор NaOH, 1M NaCl), тщательно промывали дистиллированной водой, отмывали буфером В (20 mM трис, 500 mM NaCl, pH 7,5) в количестве 2 CV и уравнивали буфером А (20 mM трис, pH 7,5) в количестве 5 CV. Подвергнутую расщеплению смесь загружали в колонку. После загрузки и вытеснения буфером А в количестве 1 CV вещество с колонки элюировали 150, 200, 250, 300 и 500 mM растворами NaCl в количестве по 2 CV каждого. Фракции, соответствующие загрузке, проскоку и элюированию, анализировали посредством SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях и окрашивания кумасси для определения фракций, содержащих ProTIA-A (фиг. 21B).

6) Приготовление и определение характеристик отщепленного фрагмента aEpCAM-aCD3.

Желаемые ProTIA-A-содержащие фракции концентрировали и проводили замену буфера на 50 mM трис, 150 mM NaCl, pH 7,5. Для выпущенной партии с целью определения качества продукта использовали протокол, установленный в примере 2 для анализа посредством SEC (фиг. 22A) и SDS-PAGE (фиг. 22B). В дополнение к этому, на 4-12%-ный бис-трис-гель загружали по 2 мкг образцов для проведения SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях с последующим окрашиванием серебром (фиг. 22C). Помимо этого, результаты SEC использовали для определения кажущейся молекулярной массы и фактора кажущейся молекулярной массы (относительно фактической молекулярной массы), а также рассчитывали гидродинамический радиус aEpCAM-aCD3. Измеренное значение кажущейся молекулярной массы составляло 39,8 МДа (при этом последнее значение примерно в 23 раза меньше, чем для приведенной выше интактной конструкции), из чего следует значение фактора кажущейся молекулярной массы 0,7 (при этом последнее значение примерно в 17 раз меньше, чем для приведенной выше интактной конструкции) и значение гидродинамического радиуса 2,3 нм (при этом последнее значение примерно в 5 раз меньше, чем для приведенной выше интактной конструкции).

Для дальнейшей идентификации данной молекулы использовали метод масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS), и экспериментально определенное значение массы составляло 58071 Да, при этом значение А_{масс} составляло +4 Да по сравнению с теоретически рассчитанной молекулярной массой 58067 Да (фиг. 23A). Результаты аналитической катионообменной хроматографии (фиг.

23В) с использованием протокола, ранее описанного в (2), также подтверждали гомогенность образца.

Пример 4. Анализы связывания с EpCAM композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Связывающую способность композиции анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проверяли с использованием сэндвич-ELISA, применяя EpCAM и конъюгированный с пероксидазой белок L. В анализе связывания с использованием ELISA плоскодонные лунки 96-луночного планшета покрывали рекомбинантными молекулами EpCAM человека (rhEpCAM) (Sino Biological R&D Systems, № по кат. 10694-H08N960-EP-50) в концентрации 0,1 мкг в 100 мкл. После инкубирования в течение ночи при 4°C используемый в анализе планшет промывали и блокировали 3%-ым раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет вновь промывали, затем вводили, в диапазоне доз, нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (т.е. ProTIA без расщепляемой последовательности отделяемого сегмента и AC1484, композицию химерного полипептидного комплекса ProTIA) и обработанный протеазой и необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC 1476). В качестве диапазона доз для нерасщепляемого и обработанного протеазой и необработанного протеазой ProTIA использовали диапазон от 0,0006 до 5 нМ, достигаемый с применением схемы серийных разведений 1:6, исходя из начальной концентрации 5 нМ. Планшет оставляли инкубироваться со встряхиванием в течение 1 ч при комнатной температуре, позволяя нерасщепляемому, расщепленному протеазой и нерасщепленному протеазой ProTIA связаться с rhEpCAM, покрывающими лунки планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляли, используя стадию промывки, и добавляли конъюгированный с пероксидазой белок L (PierceThermoFisher Scientific, № по кат. 32420). По окончании соответствующего периода инкубации, дающего возможность белку L связаться с scFv легких цепей каппа-типа, весь несвязавшийся реагент удаляли, используя стадию промывки, после чего в каждую лунку добавляли субстрат тетраметилбензидин (TMB). TMB представляет собой хромогенный субстрат пероксидазы. После достижения желаемой интенсивности окраски добавляли 0,2н. раствор серной кислоты для остановки реакции и измеряли поглощение (оптическую плотность (OD)) при 450 нм, используя спектрофотометр. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации нерасщепляемого, обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, захваченного в сэндвич-ELISA rhEpCAM и белком L. Строили график зависимости интенсивности полученной окраски (измеренной OD) от концентрации белка и концентрацию нерасщепляемого, расщепленного протеазой и нерасщепленного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, которая давала ответ в половину от максимального (EC_{50}), рассчитывали с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии, применяя программное обеспечение GraphPad Prism.

Как показано на фиг. 24, нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA обладает связывающей активностью, аналогичной активности необработанной протеазой биспецифичной молекулы анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, каждая из которых имеет EC_{50} , составляющую 320 нМ и 280 нМ, соответственно. Обработанный протеазой ProTIA обладает самой высокой связывающей активностью при EC_{50} , составляющей 120 нМ, для rhEpCAM в качестве лиганда, в сравнении с интактной необработанной протеазой биспецифичной молекулой или нерасщепляемой молекулой ProTIA. Эти данные свидетельствуют о том, что присутствие XTEN864 затрудняет связывание группировки анти-EpCAM со своим лигандом по меньшей мере в 2,3 раза.

Пример 5. Связывание с клетками по оценкам с использованием проточной цитометрии.

Биспецифичное связывание композиции анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA также оценивают в анализах, основанных на использовании метода сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) с применением CD3-положительных клеток человека линии Jurkat и EpCAM-положительных клеток человека, выбранных из SW480, HCT-116, Kato III, MDA-MB-453, MCF-7, MT3, SK-Br-3, SK-OV-3, OVCAR-3 и PC3. CD3+ и EpCAM+ клетки инкубируют с необработанным анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, а также с анти-CD3 scFv- и анти-EpCAM scFv-положительными контролями, взятыми в диапазоне доз, в течение 30 мин при 4°C в буфере для FACS, содержащем PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) с 1% BSA и 0,05% азида натрия. По окончании нескольких промывок буфером для FACS с целью удаления несвязавшегося тестируемого вещества клетки инкубируют с FITC(флуоресцеинизотиоцианат)-конъюгированным анти-телом к His-метке (Abcam, № по кат. ab1206) в течение 30 мин при 4°C. Несвязавшееся конъюгированное с FITC анти тело удаляют, используя несколько промывок буфером для FACS, и клетки ресуспендируют в буфере для FACS с целью сбора данных на проточном цитометре для FACS Calibur (Becton Dickinson) или равноценном приборе. Все полученные с использованием проточной цитометрии данные анализируют, применяя программное обеспечение FlowJo (FlowJo LLC) или равнозначное ему программное обеспечение.

Хотя не ожидали, что анти-EpCAM scFv связывается с клетками линии Jurkat, все из анти-CD3 scFv, необработанного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, как ожидается, связываются с клетками Jurkat, на что указывает увеличение интенсивности флуоресценции при сравнении с клетками Jurkat, инкубированными только с FITC-конъюгированным анти-

телом к His-метке. Аналогично, как и ожидается, анти-EpCAM scFv, обработанный и необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA все связываются с EpCAM-положительными клетками, тогда как анти-CD3 scFv, как ожидается, не связывается с EpCAM-положительными клетками. Эти данные, как ожидается, отражают способность к биспецифичному связыванию композиции анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA ввиду способности распознавать как антиген CD3, так и антиген EpCAM, экспрессируемые соответственно клетками Jurkat и панелью EpCAM-экспрессирующих линий клеток человека. Кроме того, в силу привнесения полимером XTEN некоторых помех при связывании поверхностей необработанный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, как и ожидается, связывается с меньшей аффинностью, чем обработанный протеазой ProTIA, в случае с обоими антигенами и CD3, и EpCAM.

Пример 6. Анализы цитотоксичности композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Перенаправленную клеточную цитотоксичность композиций анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оценивали с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) в качестве эффекторов и EpCAM-положительных клеток карциномы человека, таких как клетки рака толстой кишки SW480 (или выбранные из HCT-116, Kato III, NCI-N87, MKN45, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, MT3, SK-Br-3, SK-OV-3, OVCAR3 и PC3), в качестве мишеней. PBMC от отобранных здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла либо из цельной крови, либо из обогащенных лимфоцитами препаратов лейкоцитарной пленки, полученных из местных банков крови или от Bioreclamation IVT. PBMC ресуспендировали и культивировали при соответствующей плотности клеток, как обсуждается ниже, в среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS (фетальная телячья сыворотка) и HEPES (N-2-гидроксипиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) в концентрации 25 ммоль/мл, при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением до момента применения. Используют три разных типа анализов цитотоксичности для определения цитолитической активности нерасщепляемой композиции анти-EpCAM × анти-CD3 (например, AC1484), обработанной протеазой и необработанной протеазой расщепляемой композиции анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC 1278 и AC 1476), а именно анализ высвобождения лактатдегидрогеназы (LDH), анализ активности каспаз 3/7 и основанный на FACS анализ.

В качестве альтернативы анализу цитотоксичности с высвобождением ⁵¹Cr, но без использования радиоактивности, в анализе высвобождения LDH количественно измеряют стабильный цитозольный фермент LDH, который высвобождается в результате лизиса клеток в основном так же, как высвобождается ⁵¹Cr в анализах с использованием радиоактивных веществ. Измеряют высвободившуюся LDH в культуральных супернатантах, используя ферментативный анализ, в котором соль тетразолия превращается в продукт реакции - красный формазан; при этом интенсивность образующейся окраски пропорциональна количеству лизированных клеток.

Цитотоксическую активность обработанных протеазой и необработанных протеазой композиций анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в SW480 анализировали так, как приведено ниже: сначала плотность клеток SW480 и PBMC подвели до $2,5 \times 10^5$ клеток/мл и 1×10^6 клеток/мл, соответственно, в среде для анализа, содержащей RPMI без фенолового красного и содержащей 5% FCS. (Среду без фенолового красного и содержащую 5% FCS использовали для минимизации фонового поглощения при использовании набора для анализа цитотоксичности без применения радиоактивности CytoTox 96 от Promega (№ по кат. G1780)). Чтобы получить соотношение эффектора и мишени, равное 5:1, аликвоты PBMC в объеме 100 мкл культивировали совместно с аликвотами клеток SW480 в объеме 80 мкл из расчета на одну анализируемую лунку в 96-луночной планшете с круглодонными лунками. Образцы обработанных протеазой и необработанных протеазой композиций анти-EpCAM × анти-CD3 разбавляли в среде для анализа до желаемой концентрации дозы и добавляли в количестве 20 мкл в соответствующие экспериментальные лунки, доводя общий объем пробы в анализе до 200 мкл. Расщепленный протеазой ProTIA оценивали по 12 точкам, соответствующим приготовленным по схеме 5-кратного серийного разведения концентрациям доз, начиная от 440 нМ, для получения конечного диапазона доз от 0,000005 до 44 нМ. Необработанную нерасщепленную композицию ProTIA анализировали по 12 точкам, соответствующим приготовленным по схеме 5-кратного серийного разведения концентрациям доз, начиная от 184 нМ, для получения конечного диапазона доз от 0,000002 до 18,4 нМ. К этому моменту времени также готовили контроли для анализа, которые включали контроль LDH, спонтанно высвободившейся из эффекторных клеток и клеток-мишеней; контроль максимального количества LDH, высвободившейся из клетки-мишени; контроль для поправки на объем, обусловленной добавлением раствора для осуществления лизиса и фоновой культуральной среды. Для оценки LDH, спонтанно высвободившейся из клеток-мишеней, клетки SW480 инкубировали в 200 мкл среды для анализа в отсутствие какой-либо обработанной протеазой или необработанной протеазой композиции. Для оценки LDH, спонтанно высвободившейся из эффекторных клеток, PBMC инкубировали в 200 мкл среды для анализа в отсутствие какой-либо обработанной протеазой или необработанной протеазой композиции. Максимальное количество LDH, высвободившейся из клетки-мишени, определяли, добавляя 20 мкл 10× раствора для осуществления лизиса к SW480 (общий объем 220 мкл) и инкубируя клетки-мишени в присутствии раствора для осуществления лизиса в течение

45 мин, после чего собирали супернатант для измерения содержания LDH. Контроль для поправки на объем осуществляли, добавляя 20 мкл 10× раствора для осуществления лизиса к 200 мкл среды для анализа, в то время как контроль для фоновой культуральной среды получали путем инкубации 200 мкл среды для анализа. Планшет, содержащий экспериментальные лунки с обработанными протеазой и необработанными протеазой композициями анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA и все соответствующие контроли для анализа, все пробы, тестируемые в двух повторах, далее оставляли инкубироваться в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением.

Количество LDH, высвободившейся в супернатант в результате лизиса клеток, измеряли, используя набор для анализа CytoTox от Promega и следуя инструкциям производителя. Кратко, по 50 мкл супернатанта из каждой лунки используемого в анализе планшета переносили в соответствующую лунку планшета с плоскодонными лунками для работы с ферментами. В каждую лунку планшета с плоскодонными лунками для работы с ферментами добавляли по 50 мкл разведенного субстрата. Затем планшет покрывали крышкой, защищали от света и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 30 мин. По окончании желаемого периода инкубации в каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора для остановки реакции и регистрировали поглощение при 490 нм.

Затем выполняли анализ данных так, как приведено ниже.

1. Полученное в эксперименте значение при соотношении Е:Т, равном 5:1 (среднее значение) - фоновая культуральная среда (среднее значение).

Спонтанное высвобождение из SW480 как клетки-мишени (среднее значение) - фоновая культуральная среда (среднее значение).

Спонтанное высвобождение из PBMC как эффекторной клетки (среднее значение) - фоновая культуральная среда (среднее значение).

2. Максимальное высвобождение из SW480 как клетки-мишени (среднее значение) - контроль для поправки на объем (среднее значение).

3. % специфического лизиса = [(полученное в эксперименте значение - значение для спонтанного высвобождения из SW480 как клетки-мишени - значение для спонтанного высвобождения из PBMC как эффекторной клетки)/(значение для максимального высвобождения из SW480 как клетки-мишени - значение для спонтанного высвобождения из SW480 как клетки-мишени)] × 100.

4. Затем строили график зависимости % специфического лизиса от концентрации дозы обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA и концентрацию белка, которая давала ответ в половину от максимального (EC₅₀), рассчитывали с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии, применяя программное обеспечение GraphPad Prism.

Как показано на фиг. 25, воздействие на клетки SW480 обработанной протеазой композиции ProTIA и необработанной протеазой композиции анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в присутствии PBMC описывалось кривыми зависимостей цитотоксического действия от концентрации; при этом обработанный протеазой ProTIA в 48 раз более активен, чем интактный, необработанный ProTIA (EC₅₀ 2,5 пМ в сравнении с 120 пМ, соответственно).

Специфичность анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA дополнительно оценивали, сравнивая цитотоксическую активность обработанного протеазой и необработанного протеазой ProTIA с таковой у неконъюгированного моноспецифичного анти-ЕрСAМ scFv и моноспецифичного анти-CD3 scFv в анализе LDH. Кратко, PBMC и SW480 клетки совместно культивировали при соотношении эффектора и мишени, равном 5:1, в среде для анализа в 96-луночном планшете с круглодонными лунками, как описано выше. Все образцы обработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, необработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA и неконъюгированного моноспецифичного анти-ЕрСAМ scFv плюс моноспецифичного анти-CD3 scFv оценивали по 12 точкам с использованием 5-кратного серийного разведения в конечном диапазоне доз от 0,000005 до 44 нМ с конечным объемом пробы в анализе до 200 мкл. Вместе с экспериментальными лунками используемый в анализе планшет также содержал лунки со всеми релевантными контролями для анализа, которые описаны выше, и планшет инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением.

Количество LDH, высвободившейся в супернатант в результате лизиса клеток, измеряли с использованием набора для анализа CytoTox от Promega и результаты анализировали так, как описано выше.

Как и ожидалось, воздействие на клетки SW480 обработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в присутствии PBMC демонстрирует повышенную цитотоксичность по сравнению с необработанным ProTIA. Существенно, что объединение моноспецифичного анти-ЕрСAМ scFv и моноспецифичного анти-CD3 scFv в присутствии клеток-мишеней SW480 и PBMC не приводило к какой-либо цитотоксической активности (фиг. 26). Такие данные указывают на то, что присоединение направляющей группировки аЕрСAМ к эффекторной группировке аCD3 в форме биспецифичной молекулы является необходимым для активного рекрутмента CD3-положительных клеток в окружающее пространство клеток-мишеней для индуцирования цитотоксичности.

Авторы изобретения также высказали гипотезу относительно того, что расщепляемая последова-

тельность отделяемого сегмента, имеющаяся в анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, сама по себе может быть восприимчивой к расщеплению протеазами, высвобождаемыми опухолевыми клетками или активированными CD3-положительными Т-клетками (например, гранзимами). Для проработки этой гипотезы конструировали нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA без отделяемого сегмента (например, AC1357) и оценивали, в составе конъюгата, с обработанным протеазой и необработанным протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1278). Все три ProTIA тестировали в анализе на LDH, используя соотношение PBMC и SW480, равное 5:1, и тестировали по 12 точкам в диапазоне концентраций доз от 0,000005 до 44 нМ, приготовленных по схеме 5-кратного серийного разведения.

Как показано на фиг. 27, необработанный анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в 32 раза менее активен, чем обработанный протеазой ProTIA (EC_{50} 288 пМ в сравнении с 8,9 пМ). Интересно, что нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (т.е. ProTIA, не содержащий расщепляемой последовательности отделяемого сегмента) в 371 раз менее активен, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 3300 пМ в сравнении с 8,9 пМ). Такие результаты свидетельствуют о том, что отделяемый сегмент, содержащийся в расщепляемой молекуле анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, восприимчив в некоторой степени к расщеплению протеазами, вероятно высвобождаемыми из опухолевых клеток и/или активированных CD3-положительных Т-клеток.

Нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA без отделяемого сегмента (например, AC1484) и обработанный протеазой и необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) также оценивали в линии клеток, происходящих из яичников человека. В этом эксперименте PBMC смешивали с клетками яичников SK-OV-3 в соотношении 5:1 и все три молекулы ProTIA тестировали с использованием кривой зависимости от дозы, построенной по 12 точкам по схеме 5-кратного серийного разведения, в описанном выше анализе на LDH. Как ожидалось и как было обнаружено, тенденция в отношении активности у этих трех молекул ProTIA, исследованных в линии клеток яичников SK-OV-3, оказалась аналогична таковой, наблюдаемой в линии клеток колоректального рака SW480. В клетках SK-OV-3 необработанный анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA проявлял в 45 раз меньшую активность, чем обработанный протеазой ProTIA (EC_{50} 136 пМ в сравнении с 3 пМ), а нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA проявлял в 600 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 1793 пМ в сравнении с 3 пМ) (фиг. 30).

Пример 7. Анализ лизиса клеток методом проточной цитометрии.

Для анализа лизиса клеток через 24 ч с использованием проточного цитометра ЕрСAМ-положительные клетки-мишени SK-OV-3 (или клетки-мишени, выбранные из клеточных линий HCT-116, Kato III, MDA-MB-453, MCF-7, MKN45, MT3, NCI-N87, SK-Br-3, SW480, OVCAR3 и PC3) метят флуоресцентным мембранным красителем CellVue Maroon (Affymetrix/eBioscience, № по кат. 88-0870-16) в соответствии с инструкциями производителя. Альтернативно, также можно использовать PKH26 (Sigma, № по кат. MIN126) и PKH26GL. Кратко, клетки SK-OV-3 дважды промывают PBS, после чего ресуспендируют 2×10^6 клеток в 0,1 мл разбавителя С, поставляемого с набором для мечения CellVue Maroon. В отдельной пробирке смешивают 2 мкл красителя CellVue Maroon с 0,5 мл разбавителя С и затем 0,1 мл добавляют к суспензии клеток SK-OV-3. Суспензию клеток и краситель CellVue Maroon смешивают и инкубируют в течение 2 мин при комнатной температуре. Затем осуществляют гашение реакции мечения путем добавления 0,2 мл FCS. Меченые клетки дважды промывают полной средой для культивирования клеток (RPMI-1640, содержащей 10% FCS) и общее число жизнеспособных клеток определяют по вытеснению трипанового синего. При соотношении эффектора и мишени, равного 5:1, в общем объеме 200 мкл на одну лунку культивируют 1×10^5 PBMC совместно с 2×10^4 клеток SK-OV-3, меченных CellVue Maroon, из расчета на одну лунку в 96-луночной планшете с круглодонными лунками в отсутствие или в присутствии образцов обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в указанном диапазоне концентраций доз. Через 24 ч клетки собирают, используя аккутазу (Innovative Cell Technologies, № по кат. AT104), и промывают смесью 2% FCS/PBS. Перед сбором данных о клетках на проточном цитометре Guava easyCyte (Millipore) клетки ресуспендируют в 100 мкл смеси 2% FCS/PBS, дополненной 7-AAD (7-аминоактиномицин D) в концентрации 2,5 микрограммов/мл (Affymetrix/eBioscience, № по кат. 00-6993-50) с целью различения живых (7-AAD-отрицательных) и мертвых (7-AAD-положительных) клеток. Данные FACS анализируют, применяя программное обеспечение GuavaSoft (Millipore), и процентную долю мертвых клеток-мишеней рассчитывают как число 7-AAD-положительных/CellVue Maroon-положительных клеток, деленное на общее число CellVue Maroon-положительных клеток.

Кривые доза-ответ, связанный с гибелью клеток, описывающие зависимость процента цитотоксичности от концентрации ProTIA, анализируют с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии, применяя программное обеспечение GraphPad Prism; и таким образом определяют концентрацию ProTIA, которая индуцировала клеточную цитотоксичность в половину от максимальной.

Как и ожидается, результаты определения цитотоксичности с применением проточной цитометрии согласуются с результатами, полученными в анализе на LDH. Подвергание клеток SK-OV-3 воздействию протеаза-расщепленной и нерасщепленной композиций анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в отсутствие

РВМС, как и ожидается, не имеет никакого эффекта. Аналогично, РВМС, как и ожидается, не активируются в присутствии ProTIA без клеток-мишеней. Эти результаты, как и ожидается, указывают на необходимость кластеризации композиций ProTIA на поверхности клеток-мишеней, чтобы стимулировать цитотоксическую активность РВМС. В присутствии РВМС и клеток-мишеней будет наблюдаться зависимость от концентрации цитотоксический эффект, обусловленный ProTIA, предварительно обработанным или необработанным протеазой. Кроме того, как и ожидается, результаты показывают, что воздействие на клетки SK-OV-3 необработанным ProTIA (без протеазы) в присутствии РВМС будет демонстрировать сниженную цитотоксичность по сравнению с расщепленной протеазой композицией ProTIA.

Приведенный выше ряд экспериментов по определению цитотоксичности выполняют для других биспецифичных композиций ProTIA, таких как композиция анти-CD19 × анти-CD3 ProTIA и композиция анти-HER2 × анти-CD3 ProTIA. В этих случаях вместо EpCAM-положительных клеток будут использоваться CD19- и HER2-положительные клетки-мишени. Примеры линий клеток, экспрессирующих CD19, будут включать, но не ограничиваться этим, NAML-6, Blin-1, SKW6.4, Raji, Daudi и BJAB. Для направленного воздействия с использованием антител к HER2 будут использованы HER2-положительные клеточные линии, такие как SK-BR-3, BT474, HCC-1954, MDA-MB-453, SK-OV-3, NCI-N87, JIMT-1, HCT-116.

Пример 8. Анализы маркеров активации Т-клеток под действием композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Чтобы измерить содержание маркеров активации (CD69 и CD25), индуцированных анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, 1×10^5 РВМС или очищенных CD3+ клеток культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS, совместно с 2×10^4 клеток SK-OV-3 или OVCAR3 из расчета на одну анализируемую лунку (т.е. при соотношении эффектора и мишени 5:1) в присутствии анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в 96-луночном планшете с круглодонными лунками в конечном общем объеме 200 мкл. После инкубирования в течение 20 ч при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением клетки окрашивали конъюгированными с красителем PE-Cy5 (фикоэритрин и цианин-5) антителами к CD4, конъюгированными с APC (аллофикоцианин) антителами к CD8, конъюгированными с PE антителами к CD25 и конъюгированными с FITC антителами к CD69 (все антитела от BioLegend) в буфере для FACS (1% BSA/PBS) при 4°C, дважды промывали буфером для FACS и затем ресуспендировали в буфере для FACS с целью сбора данных на проточном цитометре Guava easyCyte (Millipore).

Как ожидалось и как было обнаружено, тенденция в отношении экспрессии маркеров активации Т-клеток у этих трех молекул ProTIA, исследованных в линии клеток яичников SK-OV-3, оказалась аналогична таковой, наблюдаемой в анализе цитотоксичности с высвобождением LDH. При использовании клеток SK-OV-3 было установлено, что активация CD69 в CD8 и CD4 популяциях РВМС под действием необработанного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 70 раз более слабой, чем под действием обработанного протеазой ProTIA (EC₅₀ 540 пМ в сравнении с 6,7 пМ для CD8+, EC₅₀ 430 пМ в сравнении с 6,3 пМ для CD4+), а под действием нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 1000 раз более слабой, чем под действием расщепленного протеазой ProTIA (EC₅₀ 8700 пМ в сравнении с 6,7 пМ для CD8+, EC₅₀ 6000 пМ в сравнении с 6,3 пМ для CD4+) (фиг. 42).

Аналогично, активация как CD69, так и CD25 в CD8 и CD4 популяциях РВМС клеток под действием необработанного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 60 раз более слабой, чем под действием обработанного протеазой ProTIA, а под действием нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 1300 раз более слабой, чем под действием расщепленного протеазой ProTIA (фиг. 43).

Для подтверждения того, что механизм действия осуществляется через CD3+ клетки, в качестве клеток-мишеней использовали клетки SK-OV-3, и активация CD69 в CD8 и CD4 популяциях очищенных CD3+ клеток под действием необработанного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 100 раз более слабой, чем под действием обработанного протеазой ProTIA (EC₅₀ 260 пМ в сравнении с 2,4 пМ для CD8+, EC₅₀ 240 пМ в сравнении с 2,2 пМ для CD4+), а под действием нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 2000 раз более слабой, чем под действием расщепленного протеазой ProTIA (EC₅₀ 5000 пМ в сравнении с 2,4 пМ для CD8+, EC₅₀ 5000 пМ в сравнении с 2,2 пМ для CD4+) (фиг. 44).

При использовании клеток OVCAR3 было установлено, что активация CD69 в CD8 и CD4 популяциях очищенных CD3+ клеток под действием необработанного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 10 раз более слабой, чем под действием обработанного протеазой ProTIA (EC₅₀ 14 пМ в сравнении с 1,8 пМ для CD8+, EC₅₀ 16 пМ в сравнении с 1,9 пМ для CD4+), а под действием нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 1000 раз более слабой, чем под действием расщепленного протеазой ProTIA (EC₅₀ 2000 пМ в сравнении с 1,8 пМ для CD8+, EC₅₀ 1500 пМ в сравнении с 1,9 пМ для CD4+) (фиг. 46). Активация как CD69, так и CD25 в CD8 и CD4 популяциях очищенных CD3+ клеток под действием необработанного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 10 раз более слабой, чем под действием обработанного протеазой ProTIA, а под действием нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказалась приблизительно в 1000 раз бо-

лее слабой, чем под действием расщепленного протеазой ProTIA. Эти результаты свидетельствуют о том, что необработанный анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA расщепляется во время проведения анализа в большей степени в присутствии клеток OVCAR3, чем в присутствии клеток SK-OV-3 (фиг. 47).

В качестве еще одного свидетельства активации Т-клеток под действием анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в присутствии клеток-мишеней оценивали индуцирование CD69 и гранзима В. PBMC (1×10^5) культивировали совместно с 2×10^4 клеток OVCAR3 из расчета на одну анализируемую лунку (т.е. при соотношении эффектора и мишени 5:1) в присутствии анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в 96-луночном планшете с круглодонными лунками в конечном общем объеме 200 мкл. После инкубирования в течение 20 ч при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением клетки окрашивали конъюгированными с красителем PE-Cy5 антителами к CD4, конъюгированными с APC антителами к CD8 и конъюгированными с FITC антителами к CD69 (все антитела от BioLegend) в буфере для FACS (1% BSA/PBS) при 4°C. Затем клетки фиксировали и подвергали пермеабиллизации, используя смесь 0,1% тритона X-100/PBS, после чего окрашивали PE-конъюгированными антителами к гранзиму В (ThermoFisher, № по кат. MHGB04) в буфере для FACS. Клетки промывали буфером для FACS и затем ресуспендировали в буфере для FACS с целью сбора данных на проточном цитометре Guava easyCyte.

Как и ожидалось, и CD69, и гранзим В экспрессируются в Т-клетках, активированных ProTIA, в присутствии клеток OVCAR3. Кроме того, гранзим В экспрессируется значительно большим количеством CD8+ клеток, чем CD4+ клеток (фиг. 48 и 49).

Пример 9. Фармакокинетические свойства композиции анти-ЕрСAМ × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Исследование фармакокинетических свойств анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA проводили на мышах C57BL/6. Трех мышам в группе 1 внутривенно вводили обработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1278) в дозе 4 мг/кг, и 3 мышам в группе 2 внутривенно вводили необработанный анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1278). В соответствующие моменты времени собирали кровь в обработанные гепарином лития пробирки и получали плазму. Для животных, которым вводили обработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, временные точки сбора крови для получения плазмы составляли: момент непосредственно перед введением дозы, 2, 15, 30 мин, 2 ч, 4, 8 и 24 ч. Для мышей, которым вводили необработанный ProTIA, временные точки сбора крови для получения плазмы составляли: момент непосредственно перед введением дозы, 4, 8, 24 ч, 2 сут, 4, 6 и 7 сут. Концентрацию обработанного протеазой ProTIA в плазме крови количественно определяли посредством сэндвич-ELISA, используя rhErCAM/(биотинилированное антитело к метке His) с расщепленным протеазой ProTIA в качестве стандарта; в то же время концентрацию необработанного ProTIA в плазме крови количественно определяли посредством сэндвич-ELISA, используя rhErCAM/(биотинилированное антитело к XTEN) с нерасщепленным протеазой ProTIA в качестве стандарта.

Кратко, планшет для ELISA (Nunc Maxisorp, № по кат. 442404) покрывали rhErCAM (R&D Systems, № по кат. EHH104111) в количестве 0,1 мкг/100 мкл на одну лунку. После инкубирования в течение ночи при 4°C планшет для ELISA промывали и блокировали 3%-ым раствором BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова промывали, затем добавляли соответствующие стандарты обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, взятые в диапазоне доз, соответствующие контролю качества и тестируемые образцы плазмы крови. Планшет оставляли инкубироваться со встряхиванием в течение 1 ч при комнатной температуре, чтобы дать возможность стандартам ProTIA, контролям качества и тестируемым образцам связаться с rhErCAM, покрывающими лунки планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляли, используя несколько промывок. Для обнаружения расщепленного протеазой ProTIA добавляли биотинилированное антитело к метке His (R&D Systems, № по кат. BAM050) в количестве 0,2 мкг/100 мкл и планшет оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 1 ч. Для обнаружения необработанного протеазой ProTIA добавляли биотинилированное антитело к XTEN (запатентованное Amapix антитело) в количестве 0,1 мкг/100 мкл и планшет оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 1 ч. После отмывки от несвязавшегося биотинилированного реагента добавляли стрептавидин-HRP (пероксидаза хрена) (Thermo Scientific, № по кат. 21130) в разведении 1:30000 и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. По окончании нескольких промывок в каждую лунку добавляли субстрат - TMB. TMB представляет собой хромогенный субстрат пероксидазы. После достижения желаемой интенсивности окраски добавляли 0,2н. раствор серной кислоты для остановки реакции и измеряли поглощение (OD) при 450 нм, используя спектрофотометр. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации обработанного протеазой и необработанного протеазой ProTIA, захваченного в сэндвич-ELISA, соответственно, rhErCAM/(биотинилированное антитело к метке His) и rhErCAM/(биотинилированное антитело к XTEN). Концентрацию ProTIA, присутствующего в образцах плазмы крови, определяли относительно кривой для соответствующего стандарта обработанного протеазой или необработанного ProTIA, используя программное обеспечение SoftMax Pro. Фармакокинетические расчеты периода полувыведения в конечной фазе ($T_{1/2}$) для расщепленного протеазой и нерасщепленного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA проводили, применяя GraphPad Prism.

Как ожидали, обработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA имеет короткий период полувыведения в конечной фазе ($T_{1/2}$), составляющий примерно 3,5 ч, в то время как необработанный протеазой ProTIA (с присоединенным XTEN) имеет более продолжительный $T_{1/2}$, составляющий 32 ч (фиг. 28), и это подтверждает, что интактная молекула ProTIA имеет значительно более продолжительный период полувыведения (по меньшей мере в 9 раз больше), чем расщепленная молекула.

Пример 10. Противоопухолевые свойства композиции анти-ЕрСAМ × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в модели раннего лечения SW40.

Эксперимент по эффективности *in vivo* проводили на иммунодефицитных NOD/SCID мышах (мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом и диабетом без ожирения), характеризующихся дефицитом Т- и В-клеток и нарушением природных киллерных клеток. Мышей содержали в стерильных стандартизованных внешних условиях и эксперимент проводили в соответствии с руководствами Комитета США по институциональному содержанию и использованию животных (IACUC и Ассоциации по аттестации и аккредитации (условий) содержания лабораторных животных (AAALAC)). Эффективность обработанного протеазой и не обработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1278) оценивали, используя модель ксенотрансплантата карциномы SW480 человека. Кратко, на 0-е сутки шести группам из 5 NOD/SCID мышей на одну группу подкожно в правый бок вводили 1×10^7 PBMC человека в смеси с 1×10^7 клеток SW480. Через час после инокуляции SW480/PBMC группе 1 вводили разбавитель (PBS+0,05% твина 80), группам 2 и 3 - обработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,04 мг/кг и 0,4 мг/кг, соответственно, группам 4 и 5 - необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,1 мг/кг и 1 мг/кг и группе 6 - необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 1 мг/кг. Мыши групп 1-5, но не группы 6, далее получали четыре дополнительных дозы с введением один раз в сутки, начиная с 1-х суток по 4-е сутки.

Опухоли измеряли два раза в неделю в течение 35 запланированных суток с использованием штангенциркуля в двух перпендикулярных направлениях и объемы опухолей рассчитывали, применяя формулу (ширина² × длина)/2. Также проводили тщательный мониторинг массы тела, общего внешнего вида и клинических проявлений, таких как конвульсии, тремор, заторможенность, повышенная реактивность, пилорэрекция, затрудненное/учащенное дыхание, окрашивание и изъязвление опухоли и смерть, как показателя связанной с лечением токсичности. Конечный показатель в исследовании определяли как объем опухоли 1200-2000 мм³ или выживаемость до 35-36 суток, в зависимости от того, что наступит раньше. Степень ингибирования роста опухоли в процентах (% TGI) рассчитывали для каждой подвергаемой лечению группы, применяя формулу: ((средний объем опухоли в случае разбавителя PBS в качестве контроля - средний объем опухоли в случае лечения с использованием ProTIA)/средний объем опухоли в случае разбавителя PBS в качестве контроля) × 100. Подвергаемая лечению группа с % TGI не менее 60% считается терапевтически активной.

На 26-е сутки у мышей группы 1, обработанных разбавителем PBS в присутствии эффекторных клеток человека, не наблюдали ингибирования прогрессирования опухолей, и это демонстрировало, что эффекторные клетки человека сами по себе не могут вызывать противоопухолевого эффекта. Лечение обработанным протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,04 и 0,4 мг/кг (группы 2 и 3, соответственно) в присутствии эффекторных клеток человека демонстрировало явный дозозависимый ответ в отношении подавления роста опухоли, при этом в группе с дозой 0,4 мг/кг получали более сильное защитное действие (% TGI составлял 85-84%), чем в группе с дозой 0,04 мг/кг (% TGI составлял 64-78%). Существенно то, что при лечении с использованием анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 1 мг/кг (группа 5) в присутствии эффекторных клеток человека также наблюдали ингибирование роста опухоли (% TGI составлял 78-83%) почти до такой же степени, как и при лечении обработанным протеазой ProTIA, взятым в молярно эквивалентной дозе 0,4 мг/кг (группа 3). Данные свидетельствуют о том, что в случае дозы 1 мг/кг происходило эффективное расщепление достаточного количества анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA под действием протеаз, присутствующих в окружении опухоли *in vivo*, с образованием более активной, не содержащей XTEN группировки анти-ЕрСAМ × анти-CD3, с получением наблюдаемой эффективности. Отсутствие регрессии опухоли в группе 4, получающей необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,1 мг/кг, (%TGI составлял 58%) свидетельствовало о том, что в случае этой дозы высвобождается недостаточное количество не содержащей XTEN группировки анти-ЕрСAМ × анти-CD3, чтобы индуцировать заметную регрессию опухоли. В группе 6, подвергнутой воздействию анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в виде однократной дозы 1 мг/кг, не был достигнут порог терапевтической активности (% TGI составлял 46-52%), несмотря на демонстрацию подавления роста опухоли по сравнению с контрольной группой (фиг. 31). Результаты свидетельствуют о том, что анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA может эффективно расщепляться в окружении опухоли SW480 с ингибированием прогрессирования опухоли, и концентрация лекарственного средства плюс степень воздействия являются важными факторами при определении эффективности лекарственного средства.

Следует отметить, что во всех группах, подвергнутых обработке ProTIA и разбавителем в качестве контроля, не наблюдали никакого значительного уменьшения массы тела, что указывает на хорошую

переносимость всех видов лечения (фиг. 32).

Специфичность противоопухолевой активности анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA демонстрируют на SW480/PBMC-инокулированных NOD/SCID мышам подобно исследованию, описанному выше, но с использованием восьми мышей в подвергавшейся лечению группе. В этом исследовании раннее лечение с использованием разбавителя PBS в качестве контроля, нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1357 или AC1484), ProTIA, применяемого в качестве биспецифичного отрицательного контроля (проявляющего связывающую активность в отношении CD3, но не в отношении EpCAM), анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA или обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA инициируют через один час после инокуляции SW480/PBMC. В этом исследовании используют концентрацию дозы необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, равную 1 мг/кг, как определено в приведенном выше исследовании, и применяемый в качестве отрицательного контроля биспецифичный ProTIA, тестируемые продукты нерасщепляемого и обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA вводят внутривенно в эквимоларной концентрации. Мониторинг объема опухоли, массы тела и клинических проявлений проводят два раза в неделю в течение 35 суток.

Лечение разбавителем PBS и применяемым в качестве контроля биспецифичным ProTIA в присутствии эффекторных клеток человека, как и ожидается, не вызывает противоопухолевых эффектов, и это демонстрирует, что ни эффекторные клетки человека сами по себе, ни направляющая группировка, не содержащая EpCAM, не могут вызывать противоопухолевого эффекта. Мыши в обеих этих подвергавшихся лечению группах, как и ожидается, достигают конечного показателя в исследовании (35-е сутки или объем опухоли 2000 мм³). Пять суточных доз обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в присутствии эффекторных клеток человека, как и ожидается, вызывают подавление роста опухоли. Лечение нерасщепляемым ProTIA в эквимоларной концентрации, как и ожидается, замедляет рост опухоли, но в гораздо меньшей степени, чем продемонстрировано под действием необработанного ProTIA, несущего отделяемый сегмент, поскольку в данном случае не содержится субстрата для расщепления протеазами.

Пример 11. Противоопухолевые свойства композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в модели развившегося колоректального рака.

В случае модели развившегося колоректального рака опухолевые клетки SW480 и HCT-116 независимо имплантируют мышам NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null}) или NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}.IL2rg^{tm1LWjl}/SzJ) в 0-е сутки. (NOG или NSG мыши представляют собой NOD/SCID мышей, несущих мутацию в гене IL-2Rγ, в результате чего такие мыши испытывают недостаток в Т-, В- и NK-клетках, а также характеризуются дисфункцией макрофагов, дисфункцией дендритных клеток и сниженной активностью комплемента.) Затем через промежутки времени в диапазоне от 3-х до 10-х суток вводят внутривенно или внутрибрюшинно PBMC человека. При достижении объема опухолей SW480 и HCT-116, равного 150 мм³ начинают лечение обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, интактным необработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и нерасщепляемой формой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в виде пяти суточных доз или в виде однократной дозы. Ожидается, что как расщепленный протеазой, так и необработанный протеазой ProTIA (например, AC1476) будет приводить к уменьшению или ликвидации развившихся опухолей SW480 и HCT-116, при этом необработанный протеазой ProTIA будет обеспечивать более сильное терапевтическое воздействие во времени, приводящее к более эффективному противоопухолевому эффекту и улучшенному профилю безопасности, чем обработанный протеазой ProTIA.

Нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1484), как и ожидается, замедляет рост опухоли, но в гораздо меньшей степени, чем продемонстрировано под действием необработанного ProTIA, несущего отделяемый сегмент, поскольку в данном случае не содержится последовательности субстрата для расщепления протеазами, присутствующими в окружении опухоли.

Пример 12. Цитометрический анализ с применением набора гранул для определения содержания Th1/Th2-цитокинов человека с использованием стимулированных нормальных PBMC здорового человека и интактного обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA.

В качестве оценки безопасности способности интактного, по сравнению с расщепленным, анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA стимулировать высвобождение Т-клеточных цитокинов в анализе *in vitro*, основанном на использовании клеток, анализировали панель цитокинов, включающую IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-альфа, IFN-гамма, с применением набора гранул для цитометрического анализа (CBA) на супернатантах, полученных из культивируемых PBMC человека, стимулированных образцами обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA. Антитело к CD3 человека, ОКТ3, использовали в качестве положительного контроля, а лунки с необработанным образцом служили в качестве отрицательного контроля.

Кратко, чтобы получить покрытие в виде сухой пленки, ОКТ3 (0, 10, 100 и 1000 нМ) и обработанный протеазой и необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1278 в концентрации 10, 100, 1000 и 2000 нМ) вносили в 96-луночный планшет с плоскодонными лунками, давая возможность жидкости из лунок испаряться в течение ночи в ламинарном боксе биологической защиты.

Затем лунки осторожно промывали один раз PBS и в каждую лунку добавляли по 1×10^6 PBMC в 200 мкл. Далее планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч, после чего из каждой лунки собирали супернатант тканевой культуры и анализировали на предмет содержания высвободившихся цитокинов, используя утвержденный имеющийся в продаже набор CBA (набор для определения содержания Th1/Th2-цитокинов человека с применением CBA от BD, № по кат. 551809), с применением проточной цитометрии, следуя инструкциям производителя.

Результаты.

Необработанные данные для детектируемых уровней цитокинов представлены в табл. 11 и приведены в виде графиков на фиг. 33-35.

Таблица 11

Уровни цитокинов в ответ на тестируемое соединение

Цитокин	Соединение (нМ)	Детектируемый цитокин (пг/мл)			
		Без обработки	ОКТЗ	ProTIA-X	ProTIA-A
IL-2	0	7,8			
IL-4		6,1			
IL-6		33,4			
IL-10		20,7			
TNFα		2,1			
IFNγ		0,0			
IL-2	10		12,8	9,0	7,5
IL-4			9,5	4,1	11,2
IL-6			130,2	26,3	25,2
IL-10			23,8	20,8	16,8
TNFα			6,1	4,8	2,1
IFNγ			47,4	1,5	1,1
IL-2	100		250,6	9,4	13,1
IL-4			32,7	7,7	9,2
IL-6			6658,1	22,9	56,4
IL-10			486,3	18,3	20,7
TNFα			6120,1	2,8	10,0
IFNγ			15512,9	3,5	106,5
IL-2	1000		156,0	8,1	23,8
IL-4			33,5	7,7	5,8
IL-6			7962,1	32,7	3683,7
IL-10			206,0	16,4	88,0
TNFα			10118,1	4,6	91,5
IFNγ			14060,9	0,0	1371,5
IL-2	2000			9,2	28,5
IL-4				9,8	9,7
IL-6				35,2	589,3
IL-10				16,9	163,9
TNFα				3,1	250,4
IFNγ				0,4	3330,0

Как ожидалось, в лунках с ОКТЗ, в отличие от лунок без обработки, наблюдали индуцирование устойчивой секреции всех оцениваемых цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-альфа, IFN-гамма), что тем самым подтверждает эффективность анализа цитокинов с применением набора CBA. Стимуляция обработанным протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA инициировала значительную экспрессию цитокинов, в особенности в концентрациях, превышающих 100 нМ, для всех протестированных цитокинов. В отличие от этого, детектировали исходные уровни IL-2, IL-6, IL-10, TNF-альфа и IFN-гамма, когда стимулировали интактной нерасщепленной молекулой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в диапазоне концентраций от 10 до 2000 нМ. Несмотря на то, что детектировали заметный уровень IL-4 при индуцировании необработанным протеазой ProTIA, уровень IL-4, однако, не превышал уровня, который наблюдали в случае с обработанным протеазой ProTIA (фиг. 33-35). Эти данные свидетельствуют о том, что полимер XTEN в интактной композиции ProTIA обеспечивает значительный экранирующий эффект и препятствует стимулированным PBMC цитокиновым ответам по сравнению с обработанным протеазой ProTIA, в котором часть, представляющая собой ЕрСAМ × анти-CD3, высвобождена из данной композиции.

Пример 13. Противоопухолевые свойства композиции анти-ЕрСAМ × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в модели раннего лечения НСТ-116.

Эксперимент по эффективности *in vivo* проводили на иммунодефицитных NOD/SCID мышам, характеризующихся дефицитом Т- и В-клеток и нарушением природных киллерных клеток. Мышей содержали в стерильных стандартизованных внешних условиях и эксперимент проводили в соответствии с руководствами Ассоциации по аттестации и аккредитации (условий) содержания лабораторных животных (AAALAC). Эффективность обработанного протеазой и не обработанного протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) вместе с нерасщепляемым анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (т.е. ProTIA без расщепляемой последовательности отделяемого сегмента, примером которого является

АС1484) оценивали, используя модель ксенотрансплантата колоректальной карциномы НСТ-116 человека. Кратко, на 0-е сутки четырем группам из 5 NOD/SCID мышей на одну группу подкожно в правый бок вводили 5×10^6 PBMC человека в смеси с 5×10^6 клеток НСТ-116. Через час после инокуляции НСТ-116/PBMC, и исходя из введения эквимоларных количеств, группе 1 вводили разбавитель (PBS+0,05% твина 80), группе 2 - обработанный протеазой анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг, группе 3 - необработанный протеазой анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг и группе 4 - нерасщепляемый анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,49 мг/кг. Мыши всех групп 1-4 получали четыре дополнительные дозы с введением один раз в сутки, начиная с 1-х по 4-е сутки.

Опухоли измеряли два раза в неделю в течение 35 запланированных суток с использованием штангенциркуля в двух перпендикулярных направлениях и объемы опухолей рассчитывали, применяя формулу (ширина² $\times$ длина)/2. Также проводили тщательный мониторинг массы тела, общего внешнего вида и клинических проявлений, таких как конвульсии, тремор, заторможенность, повышенная реактивность, пилоэрекция, затрудненное/учащенное дыхание, окрашивание и изъязвление опухоли и смерть, как показателя связанной с лечением токсичности. Конечный показатель в исследовании определяли как объем опухоли 1200-2000 мм или выживаемость до 35 суток, в зависимости от того, что наступит раньше. Степень ингибирования роста опухоли в процентах (% TGI) рассчитывали для каждой подвергаемой лечению группы, применяя формулу: ((средний объем опухоли в случае PBS в качестве контроля - средний объем опухоли в случае лечения с использованием ProTIA)/средний объем опухоли в случае PBS в качестве контроля) $\times$ 100. Подвергаемая лечению группа с % TGI не менее 60% считается терапевтически активной.

На 18-35-е сутки для мышей группы 1, обработанных разбавителем в присутствии эффекторных клеток человека, не наблюдали ингибирования прогрессирования опухолей и исследование прекращали при среднем объеме опухоли в группе 1823 мм³, и это демонстрировало, что эффекторные клетки человека сами по себе не могут вызывать противоопухолевого эффекта. Лечение обработанным протеазой анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг (группа 2) в присутствии эффекторных клеток человека демонстрировало устойчивое подавление роста опухоли, при этом 2/5 мышей демонстрировали полную регрессию опухоли, показывая отсутствие какой-либо опухоли измеряемого объема на 18-е сутки. Однако, начиная с 25-х суток в этой группе наблюдали возобновление роста и прогрессирование опухоли, и это приводило к тому, что для всех 5 мышей, несущих опухолевую нагрузку, исследование прекращали при среднем объеме опухоли 296 мм³. Существенно то, что использование интактного анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг (группа 3) в присутствии эффекторных клеток человека также приводило к сильному ингибированию роста опухоли. Фактически 4/5 мышей в группе 3 демонстрировали полную регрессию опухоли на 18-е сутки. С другой стороны, у 2 мышей все еще сохранялась полная регрессия на 35-е сутки, в результате чего средний объем опухоли в группе составлял 48 мм³ при прекращении исследования. Важно отметить, что в группе 4, получавшей нерасщепляемый анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,49 мг/кг, не наблюдали какого-либо устойчивого ингибирования прогрессирования опухолей с той же эффективностью, как и в группах 2 и 3, в результате 5 из 5 мышей в этой группе оставались со значительной опухолевой нагрузкой. Исследование для группы 4 прекращали на 18-35-е сутки со средним объемом опухоли в группе 748 мм³. Как обработанный протеазой анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг (группа 2), так и интактный анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг (группа 3) считаются терапевтически активными с TGI 84% и 97%, соответственно. Имея значение TGI 59%, нерасщепляемый анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA считается терапевтически неактивным. Как ожидалось и было обнаружено, средний объем опухоли в группе в случае интактного анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA значительно отличается от такового в случае группы с нерасщепляемым анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA (t-критерий Стьюдента, $p = 0,0016$). Примечательно и как было обнаружено, объем опухоли в группе в случае группы с интактным анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA также значительно отличается от такового в случае группы с обработанным протеазой анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA ($p = 0,002$). Результаты свидетельствуют о том, что в случае дозы 0,5 мг/кг происходило эффективное расщепление значительного количества анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA под действием протеаз, присутствующих *in vivo* в окружении опухоли НСТ-116, с образованием высокоактивной, не содержащей XTEN группировки анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3, обеспечивая заметную наблюдаемую регрессию опухоли. Эта гипотеза в значительной степени поддерживается при использовании нерасщепляемой молекулы анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA, не содержащей субстрата - отделяемого сегмента, что приводило к отсутствию свойства вызывания устойчивой регрессии опухоли (фиг. 38). Важно отметить, что данные также свидетельствуют о том, что анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA демонстрировал более сильное терапевтическое воздействие, чем обработанный протеазой анти-ЕрСAМ $\times$ анти-CD3 ProTIA, что тем самым говорит о более устойчивом эффекте с точки зрения регрессии опухоли.

Следует отметить, что во всех группах, подвергнутых обработке ProTIA и разбавителем в качестве контроля, не наблюдали никакого значительного уменьшения массы тела, что, как правило, указывает на хорошую переносимость всех видов лечения (фиг. 39).

Пример 14. Анализы цитотоксичности композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в присутствии очищенных CD3-положительных Т-клеток.

Чтобы продемонстрировать, что цитотоксическая активность молекул ProTIA опосредуется CD3-положительными Т-клетками, нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA без отделяемого сегмента (например, AC1484) и обработанный протеазой и необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) дополнительно оценивали в линиях SK-OV-3 и OVCAR-3 клеток яичников человека в присутствии очищенных CD3-положительных Т-клеток человека. Очищенные CD3-положительные Т-клетки человека приобретали у BioreclamationIVT и выделяли посредством негативной селекции, используя набор для выделения CD3+ Т-клеток человека MagCelect из цельной крови здоровых доноров. В этом эксперименте очищенные CD3-положительные Т-клетки человека смешивали с клетками яичников SK-OV-3 или OVAR-3 в соотношении 5:1 и все три молекулы ProTIA тестировали с использованием кривой зависимости от дозы, построенной по 12 точкам по схеме 5-кратного серийного разведения, в описанном выше анализе на LDH. Как ожидалось и как было обнаружено, тенденция в отношении активности у этих трех молекул ProTIA, исследованных в клетках SK-OV-3, оказалась аналогична таковой, наблюдаемой в клетках SK-OV-3 в анализе с применением PBMC (фиг. 30). В случае цитотоксической гибели клеток яичников SK-OV-3 под действием CD3-положительных Т-клеток человека необработанный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 56 раз меньшую активность, чем обработанный протеазой ProTIA (EC_{50} 134 пМ в сравнении с 2,4 пМ), а нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет более чем в 1000 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 2660 пМ в сравнении с 2,4 пМ) (фиг. 40). В случае цитотоксической гибели клеток яичников OVCAR-3 под действием CD3-положительных Т-клеток человека необработанный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет только в 2 раза меньшую активность, чем обработанный протеазой ProTIA (EC_{50} 0,7 пМ в сравнении с 0,3 пМ), а нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 287 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 86 пМ в сравнении с 0,3 пМ) (фиг. 41). Результаты демонстрируют, что цитотоксическая активность молекул ProTIA на самом деле опосредуется CD3-положительными Т-клетками и что восприимчивость отделяемого сегмента, содержащегося в расщепляемой молекуле анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, к протеазам, которые, как предполагается, будут высвобождаться из опухолевых клеток и/или активированных CD3-положительных Т-клеток в анализируемую смесь, по всей вероятности будет различной среди клеточных линий.

Пример 15. Анализы высвобождения маркеров активации Т-клеток и высвобождения цитокинов под действием композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Чтобы измерить индуцированную анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA экспрессию цитокинов, 1×10^5 очищенных CD3+ клеток культивировали совместно с 2×10^4 клеток SK-OV-3 из расчета на одну анализируемую лунку (т.е. при соотношении эффектора и мишени 5:1) в присутствии анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в 96-луночном планшете с круглодонными лунками в общем конечном объеме 200 мкл. После инкубирования в течение 20 ч при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе с увлажнением клеточный супернатант собирали для измерения цитокинов. Этот анализ также может быть проведен с использованием других клеток-мишеней, выбранных из клеточных линий HCT-116, Kato III, MDA-MB-453, MCF-7, MKN45, MT3, NCI-N87, SK-Br-3, SW480, OVCAR3 и PC3, а также PBMC вместо очищенных CD3+ клеток.

Количественный анализ цитокинов - интерлейкина (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, фактора некроза опухоли (TNF)-альфа и интерферона (IFN)-гамма, секретируемых в супернатант клеточной культуры, проводили с использованием набора гранул для цитометрического анализа (CBA) для определения содержания Th1/Th2-цитокинов человека (BD Biosciences, № по кат. 550749), следуя инструкции производителя. В отсутствие ProTIA никакой секреции цитокинов из очищенных CD3+ клеток, превышающей уровень фона, не ожидается. ProTIA в присутствии EpCAM-положительных клеток-мишеней и очищенных CD3+ клеток, как и ожидается, активируют Т-клетки и вызывают секрецию характерного набора Т-клеточных цитокинов с большой долей Th1-цитокинов, таких как IFN-гамма и TNF-альфа.

Как и ожидалось, анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA индуцировал устойчивую секрецию всех оцениваемых цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-альфа, IFN-гамма) (см. фиг. 50-52). Стимуляция очищенных CD3+ клеток клетками SK-OV-3 и обработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA инициировала значительную экспрессию цитокинов, в особенности в концентрациях, превышающих 20 пМ, для всех протестированных цитокинов. В отличие от этого, детектировали исходные уровни IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-альфа и IFN-гамма, когда использовали интактную нерасщепленную молекулу анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в диапазоне концентраций от 8 до 200 пМ (EC_{50} 4,3 пМ). Кроме того, фоновые уровни всех тестируемых цитокинов детектировали, когда использовали нерасщепляемую молекулу анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в диапазоне концентраций от 40 пМ до 1 нМ. Эти данные свидетельствуют о том, что полимер XTEN в интактной композиции ProTIA обеспечивает значительный экранирующий эффект и препятствует стимулированным CD3+ Т-клетками цитокиновым ответам по сравнению с обработанным протеазой ProTIA, в котором часть, представляющая собой EpCAM × анти-CD3, высвобождена из данной композиции.

Пример 16. Специфичность связывания с CD3 композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Поскольку ProTIA является биспецифичной направленно действующей композицией, связывающую способность композиции анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA также оценивали в отношении аффинности связывания с CD3 человека. Ее определяли по отношению к CD3εδ в сэндвич-ELISA, используя конъюгированный с пероксидазой белок L. В таком ELISA рекомбинантным CD3 (rhCD3εδ) (Creative BioMart, № по кат. CD3E&CD3D-219H) человека в концентрации 0,025 мкг/100 мкл покрывали плоскодонные лунки 96-луночного планшета. После инкубирования в течение ночи при 4°C используемый в анализе планшет промывали и блокировали 3%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова промывали, после чего вводили нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1484), обработанный протеазой и не обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) в диапазонах доз. В качестве диапазона доз для всех трех версий ProTIA использовали диапазон 0,002-100 нМ, который готовили по схеме серийных разведений 1:6, исходя из начальной концентрации 100 нМ. Планшет оставляли инкубироваться со встряхиванием в течение 1 ч при комнатной температуре, давая возможность нерасщепляемому, расщепленному протеазой и необработанному протеазой ProTIA связаться с rhCD3εδ, покрывающими лунки планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляли на стадии промывки и добавляли конъюгированный с пероксидазой белок L (ThermoFisher Scientific, № по кат. 32420) в количестве 0,05 мкг/100 мкл. По окончании соответствующего периода инкубации весь несвязавшийся реагент удаляли на стадии промывки, после чего в каждую лунку добавляли субстрат - тетраметилбензидин (TMB). После достижения желаемой интенсивности окраски добавляли 0,2н. раствор серной кислоты для остановки реакции и измеряли поглощение (OD) при 450 нм, используя спектрофотометр. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации нерасщепляемого, обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, захваченного в сэндвич-ELISA rhCD3εδ и белком L. Строили график зависимости интенсивности полученной окраски (измеренной OD) от концентрации белка и концентрацию нерасщепляемого, расщепленного протеазой и нерасщепленного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, которая давала ответ в половину от максимального (EC_{50}), рассчитывали с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии, применяя программное обеспечение GraphPad Prism. Результаты. Как показано на фиг. 53, необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA обладал связывающей активностью, аналогичной таковой у нерасщепляемой биспецифичной молекулы анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, при этом каждый из них имеет EC_{50} , составляющую 1800 пМ и 2200 пМ, соответственно. Обработанный протеазой ProTIA обладал самой высокой связывающей активностью с EC_{50} , составляющей 310 пМ, для rhCD3εδ в качестве лиганда, в сравнении с интактной необработанной протеазой биспецифичной молекулой или нерасщепляемой молекулой ProTIA. Поскольку блокирующая группировка XTEN864 располагается сразу после группировки анти-CD3scFv, то XTEN864 затрудняет связывание нерасщепленной структурной единицы - анти-CD3 со своим лигандом приблизительно в 5,8 раза по сравнению со связыванием отщепленной и высвободившейся части ProTIA, анти-CD3scFv, с лигандом CD3.

Пример 17. Специфичность связывания композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA).

Специфичность связывания анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) оценивали вместе с контрольными композициями ProTIA: антиCEA × анти-CD3 ProTIA (например, AC1432) и анти-HER2 × анти-CD3 ProTIA (например, AC1408) в сэндвич-ELISA с использованием целевого антигена/конъюгированного с биотином белка L. И антиCEA × анти-CD3 ProTIA (AC1432), и анти-HER2 × анти-CD3 ProTIA (AC1408) несут один и тот же компонент - анти-CD3 scFv, равно как и анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (AC1476), хотя и другой направляющий компонент. В анализе связывания с использованием ELISA рекомбинантным EpCAM человека (rhEpCAM) (R&D Systems, № по кат. 960-EP-50), рекомбинантным CEA человека (Abcam, № по кат. ab742) и рекомбинантным HER2 человека (AcroBiosystems, № по кат. HE2-H525) в концентрации 0,1 мкг/100 мкл покрывали плоскодонные лунки 96-луночного планшета. После инкубирования в течение ночи при 4°C используемый в анализе планшет промывали и блокировали 3%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова промывали, после чего вносили обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) в диапазоне доз (от 0,0007 до 0,5 нМ, который готовили по схеме серийных разведений 1:3, исходя из начальной концентрации 0,5 нМ) в покрытые EpCAM лунки, покрытые CEA лунки и покрытые HER2 лунки. Служащий в качестве контролей обработанный протеазой антиCEA × анти-CD3 ProTIA (AC1432) вносили в аналогичном диапазоне доз в покрытые CEA лунки, а обработанный протеазой анти-HER2 × анти-CD3 ProTIA (AC1408) тоже вносили в аналогичном диапазоне доз в покрытые HER2 лунки. Планшет оставляли инкубироваться со встряхиванием в течение 1 ч при комнатной температуре, давая возможность различным расщепленным протеазой ProTIA связаться с соответствующим антигеном, покрывающим лунки планшета. Несвязавшиеся компо-

ненты удаляли на стадии промывки и добавляли конъюгированный с биотином белок L (ThermoFisher Scientific, № по кат. 29997) в количестве 0,05 мкг/100 мкл. По окончании соответствующего периода инкубации весь несвязавшийся реагент удаляли на стадии промывки, после чего в каждую лунку добавляли субстрат - тетраметилбензидин (ТМБ). После достижения желаемой интенсивности окраски добавляли 0,2н. раствор серной кислоты для остановки реакции и измеряли поглощение (OD) при 450 нм, используя спектрофотометр. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации соответствующих обработанных протеазой ProTIA, захваченных соответствующим антигеном, покрывающим лунки планшета. Строили график зависимости интенсивности полученной окраски (измеренной OD) от концентрации ProTIA и соответствующую дозу по этой кривой рассчитывали с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии, применяя программное обеспечение GraphPad Prism.

Результаты. Как показано на фиг. 54 (и сопоставимо с результатами, приведенными на фиг. 24), обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA связывается с rhEpCAM, покрывающими лунки планшета, дозозависимым образом с получением для EC₅₀ значения 110 пМ. Аналогично, обработанный протеазой антиCEA × анти-CD3 ProTIA связывается с антигеном CEA, покрывающим лунки планшета, дозозависимым образом с получением для EC₅₀ значения 70 пМ, а обработанный протеазой анти-HER2 × анти-CD3 ProTIA связывается с антигеном HER2, покрывающим лунки планшета, дозозависимым образом с получением для EC₅₀ значения 47 пМ. Существенно, что никакого дозозависимого связывания для обработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, связывающегося с обоими антигенами CEA и HER2, покрывающими лунки планшета, обнаружено не было, и это указывает на то, что обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA связывается специфично с EpCAM, но не с антигеном CEA или HER2. Таким образом, данные композиции демонстрировали аффинность специфического связывания со своим целевым лигандом и не демонстрировали никакого неспецифического связывания.

Пример 18. Противоопухолевые свойства интактного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в сравнении с нерасщепляемым анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в модели раннего лечения SW480.

Восприимчивость отделяемого сегмента (RS), сконструированного в составе молекулы анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476), к протеазам, присутствующим в окружении опухоли, также оценивали *in vivo* вместе с нерасщепляемым анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1484), обработанным протеазой и необработанным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) в модели ксенотрансплантата SW480/PBMC, инокулированного мышам NOD/SCID. Подобно исследованию, описанному в примерах 10 и 13, через 1 час после инокуляции (обозначено как 0-е сутки) SW480/PBMC мышам в группе 1 вводили разбавитель (PBS с 0,05% твина 80), в группе 2 - обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг, в группе 3 - интактный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг и в группе 4 - нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,49 мг/кг. Мыши всех групп (т.е. с 1-ой по 4-ую) получали четыре дополнительные дозы с введением один раз в сутки, начиная с 1-х по 4-е сутки. Мониторинг объема опухоли, массы тела и клинических проявлений проводят два раза в неделю в течение 35 суток.

Как показано на фиг. 55, при оценке все образцы: обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг (группа 2), интактный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг (группа 3) и нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,49 мг/кг (группа 4) оказываются терапевтически активными со степенью ингибирования роста опухоли (% TGI) 93%, 95% и 80%, соответственно. Таким образом, вводимый в эквивалентных дозах интактный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA эффективно расщепляется под действием протеаз, присутствующих в окружении опухоли, с образованием высокоактивного высвободившегося анти-EpCAM × анти-CD3 (не присоединенного к группировке XTEN), демонстрируя такую же эффективность регрессии опухоли, как и обработанный протеазой АнтиEpCAM × анти-CD3 ProTIA. Как и ожидалось, несмотря на эффективность в ингибировании прогрессирования опухолей, нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA оказывается менее пригодным, чем интактный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, указывая на то, что присутствие отделяемого сегмента улучшало терапевтическую эффективность композиции путем обеспечения высвобождения связывающих доменов анти-EpCAM × анти-CD3.

Как показано на фиг. 56, некоторое уменьшение массы тела наблюдали в группе 2 и 3 в модели ксенотрансплантата SW480, что свидетельствует о некоторой возможной токсичности. Дополнительные эксперименты по определению минимальной эффективной дозы, снижению количества вводимых доз и по оценке в модели развившейся опухоли прольют больше света на такой первоначальный результат наблюдений.

Пример 19. Противоопухолевые свойства композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в модели OVCAR-3 яичников.

Эффективность *in vivo* анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA также оценивали, используя линию клеток яичников человека OVCAR-3, имплантированных внутрибрюшинно мышам NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}.IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ) или NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null}) с тяжелым иммунодефицитом. NOG или NSG мыши характеризуются дефицитом T-, B- и NK-клеток, а также дисфункцией макрофагов, дендритных

клеток и системы комплемента. Кратко, в 0-е сутки семи группам, содержащим по 5 NOG или NSG мышей на одну группу, имплантируют внутрибрюшинно 5×10^6 клеток OVCAR-3, после чего на 14-е сутки внутривенно вводят 5×10^6 РВМС. На 16-е сутки начинают лечение, при этом группе 1 вводят разбавитель (PBS+0,05% твина 80) один раз в сутки из расчета на 5 доз (qdx5), группе 2 вводят обработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг qdx5, группе 3 вводят обработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 1,05 мг/кг один раз в неделю (qw), группе 4 вводят необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг qdx5, группе 5 вводят необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 2,5 мг/кг qw, группе 6 вводят нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,49 мг/кг qdx5 и группе 7 вводят нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA в дозе 2,445 мг/кг qw. На следующей неделе все группы подвергают другому циклу лечения. Мониторинг состояния мышей на предмет поведения и выживаемости проводят один раз в сутки и два раза в неделю на предмет массы тела и вздутия брюшной полости. Кровь отбирают на 30-е сутки, 40-е сутки, 50-е сутки и 60-е сутки на предмет определения присутствия СА-125 в качестве признака развития опухоли. В случае увеличения массы животных на 30% по сравнению с 0-ми сутками животное определяют как удовлетворяющее конечному показателю в исследовании и его умерщвляют и препарируют.

Рост опухоли OVCAR-3 подтверждают развитием асцита брюшной полости, что регистрируют по увеличению массы тела, увеличению диаметра брюшной полости и возрастанию уровней СА-125 в кровотоке. Ожидается, что как расщепленный протеазой, так и необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) будет приводить к улучшению выживаемости и отсутствию или запаздыванию развития асцита. Также ожидается, что необработанный протеазой ProTIA будет оказывать более сильное терапевтическое воздействие, приводящее к более эффективному противоопухолевому эффекту и улучшенному профилю безопасности, чем обработанный протеазой ProTIA. Кроме того, нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, как и ожидается, замедляет рост опухоли, но в гораздо меньшей степени, чем продемонстрировано под действием необработанного протеазой и обработанного протеазой ProTIA, несущего отделяемый сегмент.

Пример 20. ФК свойства композиции анти-ЕрСAМ × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в модели OVCAR-3 яичников.

ФК профиль и профиль биораспределения расщепленного протеазой, необработанного протеазой и нерасщепляемого анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA оценивают, используя смесь независимо меченных металлом молекул, на несущих опухоль OVCAR-3 бестимусных BALB/c мышах. Всем облученным бестимусным BALB/c мышам внутрибрюшинно в 0-е сутки вводят десять миллионов клеток OVCAR-3. Лечение начинают, когда наблюдается заметное вздутие живота и/или когда масса тела животного увеличена на 10-15% по сравнению с 0-ми сутками. Из двадцати мышей, несущих опухоль OVCAR-3, отбирают 18 и рандомизируют в соответствии с их индивидуальной массой тела на 2 группы по 9 животных на одну группу. Одной группе из 9 мышей внутривенно вводят в дозе 1,5 мг/кг смесь, содержащую в эквивалентной концентрации: меченный металлом 1 расщепленный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, меченный металлом 2 необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA и меченный металлом 3 нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA. Другой группе из 9 животных ту же самую смесь ProTIA в дозе 1,5 мг/кг вводят внутрибрюшинно.

Чередую животных в одной и той же группе (т.е. в группах с внутривенным и внутрибрюшинным введением), отбирают кровь посредством венепункции из яремной/нижнечелюстной вены в обработанные гепарином лития пробирки через 0,5, 4, 8, 24, 48 ч, на 3-и сутки, 5-е и 7-е сутки после введения тестируемого продукта. Из крови готовят плазму путем центрифугирования при 1300 g в течение 10 мин при 4°C и хранят при -80°C до проведения анализа.

У мышей обеих групп, как с внутривенным, так и с внутрибрюшинным введением, отбирают асцитическую жидкость через 4, 8, 24, 48 ч, на 3-и сутки, 5-е и 7-е сутки после введения тестируемого продукта, чередуя животных в одной и той же группе. Образцы асцитической жидкости незамедлительно центрифугируют при 300 g в течение 10 мин при 4°C и жидкий компонент замораживают при -80°C до проведения анализа.

По три мыши из каждой группы будут умерщвлены в 3-й сутки, 5-е сутки и 7-е сутки. Собирают органы (головной мозг, сердце, печень, легкое, селезенку и поджелудочную железу) и опухолевые узлы в полости брюшины, взвешивают, быстро замораживают и хранят при -80°C до проведения анализа.

Все образцы (кровь, асцитическую жидкость, здоровые органы и опухолевые ткани) анализируют посредством ICP-MS (масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой). Для группы с внутривенным введением, как и ожидается, в асцитической жидкости обнаружено небольшое количество всех 3-х ProTIA. Являющиеся компонентами плазмы меченный металлом 2 необработанный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA и меченный металлом 3 нерасщепляемый анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA, как и ожидается, демонстрируют более длительный период полувыведения из системного кровотока, чем меченный металлом 1 расщепленный протеазой анти-ЕрСAМ × анти-CD3 ProTIA. Для группы с внутрибрюшинным введением, как и ожидается, в асцитической жидкости обнаружены все 3 версии ProTIA,

при этом меченный металлом 2 необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и меченный металлом 3 нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA имеют более продолжительный период времени удержания в полости брюшины по сравнению с меченым металлом 1 расщепленным протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA. Также ожидается, что меченный металлом 2 необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA будет иметь более короткий период полувыведения из внутрибрюшинного пространства, чем меченный металлом 3 нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, ввиду расщепления протеазами, обнаруживаемыми в занятой опухолью области внутрибрюшинного пространства. Меченный металлом 2 необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и меченный металлом 3 нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA будут обнаруживаться в минимальном количестве в плазме в ранние моменты времени, что указывает на незначительно просачивание молекул, введенных внутрибрюшинно, в системный кровоток. Все 3 версии ProTIA, как и ожидается, присутствуют в опухолевых узлах, извлеченных из полости брюшины, но не из нормальных органов.

Пример 21. Противоопухолевые свойства композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в модели SK-OV-3 яичников.

Эффективность *in vivo* анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA также оценивали, используя линию клеток яичников человека SK-OV-3, имплантированных внутрибрюшинно мышам NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}.IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ) или NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null}) с тяжелым иммунодефицитом. NOG или NSG мыши характеризуются дефицитом T-, B- и NK-клеток, а также дисфункцией макрофагов, дендритных клеток и системы комплемента. Кратко, в 0-е сутки семи группам, содержащим по 5 NOG или NSG мышей на одну группу, имплантируют внутрибрюшинно 5-10×10⁶ клеток SK-OV-3, после чего на 5-е сутки внутрибрюшинно вводят 5-10×10⁶ PBMSC. На 7-е сутки начинают лечение, при этом группе 1 вводят разбавитель (PBS+0,05% твина 80) один раз в сутки из расчета на 5 доз (qdx5), группе 2 вводят обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,21 мг/кг qdx5, группе 3 вводят обработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 1,05 мг/кг один раз в неделю (qw), группе 4 вводят необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,5 мг/кг qdx5, группе 5 вводят необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 2,5 мг/кг qw, группе 6 вводят нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 0,49 мг/кг qdx5 и группе 7 вводят нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA в дозе 2,445 мг/кг qw. Мониторинг состояния мышей на предмет поведения и выживаемости проводят один раз в сутки и два раза в неделю на предмет массы тела и вздутия брюшной полости. В случае увеличения массы животных на 30% по сравнению с 0-ми сутками животное определяют как удовлетворяющее конечному показателю в исследовании и его умерщвляют и препарируют.

Рост опухоли SK-OV-3 подтверждают развитием асцита брюшной полости, что регистрируют по увеличению массы тела, увеличению диаметра брюшной полости и возрастанию уровней СА-125 в кровотоке. Ожидается, что как расщепленный протеазой, так и необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA (например, AC1476) будет приводить к улучшению выживаемости и отсутствию или запаздыванию развития асцита. Также ожидается, что необработанный протеазой ProTIA будет оказывать более сильное терапевтическое воздействие, более эффективный противоопухолевый эффект и обладать улучшенным профилем безопасности, чем обработанный протеазой ProTIA. Кроме того, нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, как и ожидается, замедляет рост опухоли, но в гораздо меньшей степени, чем продемонстрировано под действием необработанного протеазой и обработанного протеазой ProTIA, несущего отделяемый сегмент.

Пример 22. Эффективность композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) в образцах злокачественного асита человека.

Образцы злокачественного асита человека собирают от пациентов с первичными EpCAM-положительными эпителиальными интраперитонеальными злокачественными новообразованиями, которые включают но не ограничиваются этим, пациентов с распространенным, рецидивирующим и плохо поддающимся лечению раком яичников (аденокарциномой и муцинозным раком), колоректальным раком, раком желудка, желчных протоков/холангиокарциномой, раком фатерова соска, поджелудочной железы и несветлоклеточным раком почки. Пациентов, получающих химиотерапию, иммунотерапию, терапию биологическими средствами и/или кортикостероидами в течение последних 30 суток перед отбором образцов, исключали. Образцы злокачественного асита центрифугируют при 300-400 g в течение 10 мин при комнатной температуре и собирают жидкий компонент и осадок после центрифугирования. Количественное определение концентрации протеаз человека, включая, но не ограничиваясь этим, MMP-9, MMP-2, матрипразу и uPA, в жидком компоненте выполняют, используя имеющиеся в продаже наборы для ELISA (набор для MMP-9 человека, Invitrogen, № по кат. KHC3061 или его эквивалент; для MMP-2 человека, Invitrogen, № по кат. KHC3081 или его эквивалент; для матрипразы человека, Enzo, № по кат. ADI-900-221, и для uPA человека, Abscam, № по кат. 119611), следуя инструкциям производителя. Степень расщепления интактного анти-EpCAM × анти-CD3 (например, AC1476) протеазой, обнаруженной в асцитической жидкости, определяют посредством введения ProTIA в известной концентрации в компо-

нент асцитической жидкости и инкубирования смеси при 37°C вместе с аликвотой, отобранной в указанные моменты времени, а именно 0,5, 2, 4, 8, 24, 48 ч, 3-е сутки, 4-е, 5-е и 7-е сутки. Количество интактного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, присутствующего в соответствующие моменты времени, затем определяют в сэндвич-ELISA с применением rhEpCAM/(биотинилированное антитело к XTEN), используя интактный анти-EpCAM × анти-CD3 в качестве стандарта.

Кратко, планшет для ELISA (Nunc Maxisorp, № по кат. 442404) покрывают rhEpCAM (R&D Systems, № по кат. EHH104111) в количестве 0,1 мкг/100 мкл на одну лунку. После инкубирования в течение ночи при 4°C планшет для ELISA промывают и блокируют 3%-ым раствором BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова промывают, после чего добавляют соответствующие стандарты интактного, необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, взятые в диапазоне доз, соответствующие контролю качества и тестируемые образцы асцитической жидкости с введенным ProTIA. Планшет оставляют инкубироваться со встряхиванием в течение 1 ч при комнатной температуре, чтобы дать возможность стандартам ProTIA, контролям качества и тестируемым образцам связаться с rhEpCAM, покрывающими лунки планшета. Несвязавшиеся компоненты удаляют, используя несколько промывок. Добавляют биотинилированное антитело к XTEN (запатентованное Amunix антитело) в количестве 0,1 мкг/100 мкл и планшет оставляют инкубироваться при комнатной температуре в течение 1 ч. После отмывки от несвязавшегося биотинилированного реагента добавляют стрептавидин-HRP (Thermo Scientific, № по кат. 21130) в разведении 1:30000 и планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. По окончании нескольких промывок в каждую лунку добавляют субстрат - TMB. После достижения желаемой интенсивности окраски добавляют 0,2н. раствор серной кислоты для остановки реакции и измеряют поглощение (OD) при 450 нм, используя спектрофотометр. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации интактного ProTIA, захваченного в сэндвич-ELISA с использованием rhEpCAM/(биотинилированное антитело к XTEN). Концентрацию интактного ProTIA, присутствующего в тестируемых образцах асцитической жидкости, определяют относительно кривой для указанного стандарта интактного ProTIA, используя программное обеспечение SoftMax Pro. Степень уменьшения содержания интактного ProTIA, который детектируется в сэндвич-ELISA с применением rhEpCAM/(биотинилированное антитело к XTEN), (т.е. период полувыведения), определяют, используя GraphPad Prism.

В отношении осадка после центрифугирования асцитической жидкости проводят фенотипическое исследование экспрессии EpCAM, CD3, CD4, CD8, CA125 и CD56. Образцы злокачественного асцита, по результатам тестирования являющиеся положительными на EpCAM и CD3, используют для анализа цитотоксического действия с применением обработанного протеазой и необработанного протеазой ProTIA. Кратко, 1×10^5 асцитных клеток ресуспенсируют в соответствующем количестве асцитической жидкости и оставляют прикрепляться в 24-луночном планшете в течение 24 ч в трех повторах. Клетки обрабатывают в течение 48 ч, в разных концентрациях доз, обработанным протеазой и интактным анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, после чего выполняют количественное определение каспаз 3/7, используя люминогенный субстрат каспаз 3/7, в соответствии с инструкциями производителя (набор Caspase-Glo 3/7 от Promega, № по кат. G8091). Затем, с учетом того, что сигнал люминесценции пропорционален активности каспаз 3/7, строят график зависимости сигнала люминесценции от концентрации дозы обработанного протеазой и необработанного протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA и концентрацию белка, которая даст ответ в половину от максимального (EC_{50}), рассчитывали с использованием 4-параметрического уравнения логистической регрессии, применяя программное обеспечение GraphPad Prism. Предполагают, что злокачественный человеческий асцит, полученный от пациентов с распространенным, рецидивирующим и плохо поддающимся лечению EpCAM-положительным раком, будет содержать все компоненты, необходимые для расщепления и последующей активации интактного анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA с образованием не содержащей XTEN группировки анти-EpCAM × анти-CD3, которая проявляет сильную цитотоксическую активность. Также ожидают уменьшения количества EpCAM-положительных клеток, что является признаком устранения опухоли, и увеличения количества маркеров активации Т-клеток, таких как CD69 и гранзимы, что является отражением активации Т-клеток.

Пример 23. Анализ композиции анти-EpCAM × анти-CD3 протеаза-запускаемого иммунного активатора (ProTIA) с использованием каспаз 3/7.

Перенаправленную клеточную цитотоксичность композиций анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA также оценивали по активности каспаз 3/7 в апоптотических клетках. Аналогично описанному выше анализу цитотоксичности с высвобождением LDH смешивали PBMC или очищенные CD3-положительные Т-клетки с EpCAM-положительными опухолевыми клетками-мишенями, такими как клетки SW480, SK-OV-3 и OVAR-3, в соотношении 5 эффекторных клеток к 1 клетке-мишени, и клетки HCT-116, в соотношении 10:1, и все три версии ProTIA тестировали по 12 точкам, соответствующим концентрациям доз, приготовленным по схеме 5-кратного серийного разведения, как в описанном выше анализе на LDH.

После лизиса клеток измеряли содержание высвободившихся в культуральные супернатанты каспаз 3/7 по количеству расщепленного под действием каспаз 3/7 люминогенного субстрата каспаз 3/7 с генерацией сигнала люминесценции "медленного типа (glow-type)" (набор Caspase-Glo 3/7 от Promega, № по

кат. G8091). Интенсивность люминесценции пропорциональна каспазной активности.

Как ожидалось и как было обнаружено, тенденция в отношении активности у обработанного протеазой, необработанного протеазой и нерасщепляемого анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA, исследованных в линиях опухолевых клеток SK-OV-3, OVCAR-3, HCT-116 и SW48, находилась в соответствии с активностями, наблюдаемыми в анализе с тестированием LDH. В случае цитотоксической гибели клеток яичников SK-OV-3 под действием PBMC человека необработанный анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 12 раз меньшую активность, чем обработанный протеазой ProTIA (EC_{50} 140 пМ в сравнении с 12 пМ), а нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 390 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 4770 пМ в сравнении с 12 пМ) (фиг. 57). В случае цитотоксической гибели клеток яичников OVCAR-3 под действием PBMC нерасщепленный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 4 раза меньшую активность, чем обработанный протеазой ProTIA (EC_{50} 9,8 пМ в сравнении с 2,5 пМ), а нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 420 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 1043 пМ в сравнении с 2,5 пМ) (фиг. 58). В случае цитотоксической гибели клеток HCT-116 колоректального рака под действием PBMC обработанный протеазой и интактный необработанный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляют почти одинаковую активность (EC_{50} 1,8 пМ в сравнении с 3,6 пМ), а нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 130 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 240 пМ в сравнении с 1,8 пМ) (фиг. 59). В случае цитотоксической гибели клеток SW480 колоректального рака под действием PBMC обработанный протеазой и нерасщепленный протеазой анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA также демонстрировали схожую активность (EC_{50} 2 пМ в сравнении с 1 пМ), а нерасщепляемый анти-EpCAM × анти-CD3 ProTIA проявляет в 70 раз меньшую активность, чем расщепленный протеазой ProTIA (EC_{50} 148 пМ в сравнении с 2 пМ) (фиг. 60). Результаты демонстрировали, что нерасщепляемый ProTIA неизменно проявляет меньшую активность, чем группировка анти-EpCAM × анти-CD3, не содержащая XTEN. В зависимости от используемых клеточных линий активность интактного, необработанного протеазой ProTIA изменялась в диапазоне от аналогичной до в 12 раз более низкой активности по сравнению с расщепленным протеазой ProTIA, подтверждая разницу в степени восприимчивости отделяемого сегмента к протеазам, которые, как предполагается, будут высвобождаться из опухолевых клеток и/или активированных CD3-положительных Т-клеток в анализируемую смесь.

Пример 24. Протеолитическое расщепление aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN_AE864-His(6), конструкции AC1476, с использованием различных протеаз.

Этот эксперимент проводили для демонстрации того, что aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN_AE864-His(6), конструкция AC1476, описанная ранее в примере 3, может быть расщеплена *in vitro* под действием многочисленных опухолеассоциированных протеаз, включая MMP-2, MMP-9 и эластазу нейтрофилов.

1. Активация ферментов.

Все использованные ферменты получали от R&D Systems. Рекombинантная эластаза нейтрофилов и рекombинантная матриптаза человека поступали в виде активированных ферментов и их хранили при -80°C до момента применения. Рекombинантная мышьяная MMP-2 и рекombинантная мышьяная MMP-9 поставлялись в виде зимогена, и для их активации требовалась обработка 4-аминофенилацетатом ртути (APMA). APMA сначала растворяли в 0,1 М растворе NaOH до конечной концентрации 10 мМ, после чего pH подводили до нейтрального значения, используя 0,1н. раствор HCl. Дальнейшее разбавление исходного раствора APMA до концентрации 2,5 мМ выполняли в 50 мМ трис-буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 10 мМ CaCl_2 , pH 7,5. Чтобы активировать про-MMP, инкубировали 1 мМ APMA и про-MMP в концентрации 100 мкг/мл при 37°C в течение 1 (MMP-2) или 3 ч (MMP-9). К активированным ферментам добавляли глицерин до конечной концентрации 50% и затем каждый из них хранили при -20°C .

2. Ферментативное расщепление.

Для расщепления композиции ProTIA, AC1476 aEpCAM-aCD3-BSRS1-XTEN_AE864-His(6), использовали панель ферментов. Данную композицию в концентрации 10 мкМ в качестве субстрата инкубировали по отдельности с каждым ферментом в следующих молярных соотношениях фермента к субстрату: MMP-2 (1:200), MMP-9 (1:2000), матриптаза (1:12,5) и эластаза нейтрофилов (1:1000). Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего расщепление останавливали, добавляя краситель для нанесения на гель и нагревая при 80°C .

3. Анализ расщепления.

Анализ образцов проводили, нанося 5 мкг нерасщепленного и расщепленного вещества на гель для SDS-PAGE и окрашивая кумасси синим. После обработки каждой протеазой, действующей по отделяемому сегменту BSRS-1, для данного субстрата получали два фрагмента, детектируемых в геле после проведения SDS-PAGE, при этом небольшой фрагмент содержал aEpCAM-aCD3 (активированную форму первой части со связывающими доменами), а другой содержал высвободившуюся объемную группировку XTEN, которая перемещается при проведении SDS-PAGE со слегка меньшей кажущейся молекулярной массой, чем у интактной формы. В случае эластазы нейтрофилов, которая помимо этого расщепляет высвободившийся XTEN, в геле наблюдали активированную форму, а также другие более мелкие фрагменты; последние - ввиду расщепления XTEN в различных положениях вдоль всей последователь-

ности. Эти результаты свидетельствуют о том, что, как и предполагалось, все протестированные протеазы расщепляли данную конструкцию с высвобождением связывающих доменов.

Таблица 12

Последовательности химерного полипептидного комплекса

ID (идентиф. код) конструк- ции	Мишени опухолей	Аминокислотные последовательности
AC1277	CD19	HHHHHHHHDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGD SYLNWYQQIPG QPPKLLIYDASNLSVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTED PWTFGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKAS GYAFSSYWMNWVKQRPQGGLWIGQIWPBGDGTNYNGKFKGKATLTADESSST AYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSSGGGGGDI KLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGGLWIGYINPSR
		GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDY WGQGTTLTVSSVEGGSGGGSGGGSGGVDDIQLTQSPAISASPGKVTMTCR ASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPRFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYQCQWSSNPLTFGAGTKLELKGTAEAASASGLSGRSDNHSPLGLA GSPGPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1278	EpCAM	HHHHHHHHELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYQCNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPBGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDVQL VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYCYCARYDDHYCLDYWG QGTTVTTVSSGEGTSTGSGSGSGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSYMNWYQQKPKAPKRWIYDTSKVASGVPRFSGSGSGTDYSLTINSLA EDAATYQCQWSSNPLTFGGGKVEIKGTAEASASGLSGRSDNHSPLGLAGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1345	EpCAM	HHHHHHHHEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPBGH LEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCA RLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASG

		YTFTRYTMHWVRQAPQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTA YMESSSLRSEDATATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGG SGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPKGAPKRWIY DTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGT KVEIKGGGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQN DYSYPLTFGAGTKLEIKGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPG
AC1346	EpCAM	HHHHHHHHDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPQGGL EWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATATYYCAR YYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSL LNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGGSGGGSEVQLLEQ SGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIH YNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDWGQG TTVTVSSGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKA PKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPL TFGGGTKEIKGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP G

AC1357	EpCAM	HHHHHHHHELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLT FEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVVSSGGGGSDVQL VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWG QGT TTVVSSGEGTSTGSGGSGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSYMNWYQQKPKGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEA EDAATYYCQQWSNPLTFGGGTKVEIKGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1358	EpCAM	HHHHHHHHELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLT FEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVVSSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGRVTTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKRTS GPGDGGKGGPGKPGGEGTKGTGPGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAY LQMNSLR AEDTAVYYCARSGYGDSDWYFDVWGQGT LVTVSSGTAE AASAGL SGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET

		PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1359	EpCAM	HHHHHHHHELVMQTSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGV STYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGDSWDYFD VWQGQTLTVSSRTSGPGDGGKGGPGKPGGEGTKGTGPGGDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTTICRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESVPSRFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGTAEAAASAGL SGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1409	EpCAM	HHHHHHHGHGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGLSGRSDNHSPLGLAGSGTAEA ASASGELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYP LTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKAS GYAFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDVQLVQS GAEVKKPGASVKVCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTN ADSVKGRFTITTDKSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGT TVTVSSGEGTSTGSGGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV SYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDA ATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGSPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG

[illegible]

		SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1412	EpCAM	HHHHHHHHEVQLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPBGH LEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCA RLNRNWDPEMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAG EKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFT GSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSDVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYTMHWVRQAPQGLEWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATATYYCARYDDHYCLDYWG QGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGSGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEA EDAATYYCQWSSNPLTFGGGTKEIKGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1413	EpCAM	HHHHHHHHDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYTMHWVRQAPQGL EWIGYINPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATATYYCAR YYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGGGGADDIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSG TDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPLTFGGGTKEIKGGGGSELVMTQSPS SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGG GSGGGGGSGGGSEVQLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYFCARLRNWDPEMDYWGQGTTVTVSSGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA

		TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1414	EpCAM	HHHHHHHHDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNYQQKPGKAPKR WIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPLTFG GGTKVEIKGEGTSTGSGSGSGGGADDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGY TFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAY MELSSLRSEDATATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGGGGSLVMTQSPS SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES GVPRDFTGSGSGTDFTLTISVVQAEADLAVYYCQNDYSYPLTFGATKKLEIKGG GGSGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSA VYFCARLRNWDPMQDYWGQGTITVTVSSGTAEASASGLSGRSDNHSPLGLAGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AC1476	EpCAM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI YQMSNLAGVPSRFSSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQG TKVEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQLVQSGPGLVQPGGS VRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTGESTYADSFKGRFTF SLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSSGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLE SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNLTPWTFGQGTKEIKG ATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKN TAYLQMSNLRADTAVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGTLLTVSSGTAEASA SGLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE

		GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGHHHHHH
AC1484	EpCAM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPKAPKLLI YQMSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQG TKVEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGQVQLVQSGPGLVQPGGS VRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTGETSYADSFKGRFTF SLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKAPKLLIYYTSRLE SGVPSRFSGSGSDTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKG ATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEGVQLVSEGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKN TAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGTLLTVSSGSPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGHHHHHH
AC1489	EpCAM	DIVMTQSPSLSLPVTPEGPASISCRSSKNLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLI YQMSNLASGVPDFRFSFGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLEIPRTFGQG TKVEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGQVQLVQSGPEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYGEDFKGRFAF SLDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARFGNYVDYWGQGLVTVSSGGGGSEL VVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPKQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCALWYSLNWVFGGGTKLTV LGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEGVQLLESGGGLVQPGGSLKLS AASGFTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSSGTA

[illegible]

		EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEESGSPAGSPTSTEESGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEESGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TESATPESGPGTSTEPSEGSAPLSGRSDNHSPLGLAGSGTAEASASGDIQM TQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLTPWTFQGQTKVEIKGAT PPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGTLLTVSSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDVRTITCRSTKSLHNGITYLYWYQQKPGKAPKLLIYQMSN LASGVPSRFSSSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTKEI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVQSGPGLVQPGGSVRI AASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTS ASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSS
AC1510	EpCAM	HHHHHHGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEESGSPAGSPTSTEESGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEESGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQ DIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ EDFATYYCQQGNLTPWTFQGQTKVEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEP PGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVA LINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYY GDSWDYFDVWGQGTLLTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSTKS LLHNGITYLYWYQQKPGKAPKLLIYQMSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTKEIKGATPPETGAETESPGETTGGSA ESEPPEGEVQLVQSGPGLVQPGGSVRI AASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGL EWMGWINTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCAR FAIKGDYWGQGTLLTVSS
AC1501	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYYTTPTFQGQTKVEI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS

		KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYTSRLES GVPSRFSGSGSDTYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGA TPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGTTLVTVSSGTAEAAAS GLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGHHHHHH
AC1502	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSRSGSDTYTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPFTFGQGTKVEIK KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYTSRLES GVPSRFSGSGSDTYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGA TPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFDVWGQGTTLVTVSSGSPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGHHHHHH
AC1503	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGAPKLLIYSASF

		LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYYTTPPTFGQGTKVEI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGGSELV VTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLGGAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVL GATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGTAE AASASGLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSPAGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGHHHHH
AC1504	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYYTTPPTFGQGTKVEI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGGSELV VTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLGGAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVL GATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLES GGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVSSGSPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA

		GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGHHHHH
AC1505	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASY RYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKEI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFTDYMWDVRQAPGKLEWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTLTVSSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLESG VPSRFSFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQGGNTLPWTFGQGTKEIKGAT PPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGLTLTVSSGTAEAAASG LSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGHHHHH
AC1506	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKGAPKLLIYSASY RYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKEI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFTDYMWDVRQAPGKLEWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTLTVSSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLESG VPSRFSFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQGGNTLPWTFGQGTKEIKGAT PPETGAETESPGETTGGSAESEPPEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGLTLTVSSGSPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
		EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS

Таблица 13

Последовательности связывающих доменов первой части

ID конструк- ции	Мишени опухолей	Аминокислотные последовательности
AC1277	CD19	HHHHHHHHDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGD SYLNWYQQIPG QPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAATYHCQQSTED PWTFGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKAS GYAFSSYWMNWVKQRPQGGLWIGQIWPBGDGTNYNGKFKGKATLTADESSST AYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDI KLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGGLWIGYINPSR GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYCYARYDDHYCLDY WGQGTTLTVSSVEGGSGGGSGGGSGGVDDIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCTC ASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTGYSLTISSM EAEDAATYYCQWSSNPLTFGAGTKLELKGTAEEAASASGLSGRSDNHSPLG
AC1278	EpCAM	HHHHHHHHVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDVQL VQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPQGGLWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYDDHYCLDYWG QGTTVTVSSGEGTSTGSGGGSGGGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEA EDAATYYCQWSSNPLTFGGGKVEIKGTAEEAASASGLSGRSDNHSPLG
AC1345	EpCAM	HHHHHHHHVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPBGH LEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA RLRNWDEPMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASG YTFTRYTMHWVRQAPQGGLWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTA YMELSSLRSEDTATYYCARYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGEGTSTGSGGGSGG SGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIY DTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPLTFGGGT KVEIKGGGGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQN DYSYPLTFGAGTKLEIKGTAEEAASASGLSGRSDNHSPLG
AC1346	EpCAM	HHHHHHHHVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPQGGL EWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCAR YYDDHYCLDYWGQGTTVTVSSGGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSL LNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGEVQLLEQ SGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIH YNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQ TTVTVSSGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKA PKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQWSSNPL TFGGGTKEIKGTAEEAASASGLSGRSDNHSPLG

AC1358	EpCAM	HHHHHHHELMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGSGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGQTKVEIKRTS GPGDGGKGGPGKPGGEGTKGTGPGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGT LVTVSSGTAEAAASAGL SGRSDNHSPLG
AC1359	EpCAM	HHHHHHHELMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGSGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGV STYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFD VWGQGT LVTVSSRTSGPGDGGKGGPGKPGGEGTKGTGPGGDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLESGVPSRFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGQTKVEIKGTAEAAASAGL SGRSDNHSPLG
AC1409	EpCAM	LAGSGTAEAAASAGELVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVY YCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGSGGGSEVQLLEQSGAELVRPGT SVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGGG GSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYI NPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHY CLDYWGQGT TTVTVSSGEGTSTGSGSGSGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLT INSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLG
AC1410	EpCAM	LAGSGTAEAAASAGELVMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYL TWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVY YCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGSGGGSEVQLLEQSGAELVRPGT SVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGGG GSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYI NPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHY CLDYWGQGT TTVTVSSGEGTSTGSGSGSGSGGADDIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLT INSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKHHHHHHHH
AC1411	EpCAM	HHHHHHHELMTQSPSSLT VTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQK PGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLEIKGGGSGGGSGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISC KASGYAFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTFEDSAVYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGGGGSDIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASG VPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGEGT STGSGSGSGSGGADDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTRYTMHWVRQ APGQGLEWIGYINPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTA TYYCARYYDDHYCLDYWGQGT TTVTVSSGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLG

AC1412	EpCAM	HHHHHHHEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQRPGHG LEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT FEDSAVYFCA RLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSELVMTQSPSSLTVTAG EKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFT GSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGGGGSDVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATATYTCARYYDDHYCLDYWG QGTTVTVSSGEGTSTGSGGSGGGGADDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEA EDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGTAEASASGLSGRSDNHSPLG
AC1413	EpCAM	HHHHHHHHDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTRYTMHWVRQAPGQGL EWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATATYTCAR YYDDHYCLDYWGQGT TTVTVSSGEGTSTGSGGSGGGGADDIVLTQSPATLSLS PGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSG TDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGGGGSELVMTQSPS SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGG GSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT FEDSA VYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGTAEASASGLSGRSDNHSPLG
AC1414	EpCAM	HHHHHHHHDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKR WIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFG GGTKVEIKGEGTSTGSGGSGGGGADDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGY TNYADSVKGRFTITTDKSTSTAY MELSSLRSEDATATYTCARYYDDHYCLDYWGQGT TTVTVSSGGGSELVMTQSPS SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLEIKGG GSGGGGSGGGGSEVQLLEQSGAELVRPGTSVKISCKASGYAFTNYWLGWVKQ RPGHGLEWIGDIFPGSGNIHYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT FEDSA VYFCARLRNWDEPMDYWGQGT TTVTVSSGTAEASASGLSGRSDNHSPLG
AC1476	EpCAM	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSTKSLLSNGITYLYWYQQKPGKAPKLLI YQMSNLAGSVPSRFSSSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQG TKVEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQLVQSGPGLVQPGGS VRISCAASGYFTNYGMNWVRQAPGKLEWMGWINTYTGESTYADSFKGRFTF SLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSSGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSRLE SGVPSRFSGSGSGTDYTLT ISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKG ATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYSFTGYTMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGT LVTVSSGTAEASA SGLSGRSDNHSPLG
AC1489	EpCAM	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSKNLLHSNGITYLYWYLLQKPGQSPQLLI YQMSNLAGSVVDRFSSSGSGTDFTLISRVEAEDVGYYCAQNLEIPRTFGQG TKVEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQLVQSGPEVKKPGAS VKVSCASGYFTNYGMNWVRQAPGQLEWMGWINTYTGPTYGEDFKGRFAF SLDTSASTAYMELSSLRSEDATAVYFCARFGNYVDYWGQGS LVTVSSGGGSEL VVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGLKLT LGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLES GGGLVQPGGSLKLS AASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSGT EAASASGLSGRSDNHSPLG
AC1507	EpCAM	LAGSGTAEASASGDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIRNYLNWYQQK

		PGKAPKLLIYYTSRLESQVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGN TLPWTFGQGTKEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYN QKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGSDSWYFDVWGQ GTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSTKSLHSNGITYLYW YQKPKGAPKLLIYQMSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC AQNLEIPRTFGQGTKEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQVQL VQSGPGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWGWINTYTGE STYADSFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGT LLTVSS
AC1501	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQKPKGAPKLLIYYTSRLES GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGA TPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGSDSWYFDVWGQGTTLVTVSSGTAEASAS GLSGRSDNHSPLG
AC1503	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKEIK KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGSELV VTQEPSTLVSPGGTTLTLCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLGGAALTLVSGVQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVL GATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLVTVSSGTAE AASASGLSGRSDNHSPLG
AC1505	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSIGVAVYQKPKGAPKLLIYSASY RYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPTFGQGTKEIK KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLSVDRS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTTLVTVSSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQKPKGAPKLLIYYTSRLES VPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGAT PPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG YSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGSDSWYFDVWGQGTTLVTVSSGTAEASASG LSGRSDNHSPLG
AC1518	HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSIGVAVYQKPKGAPKLLIYSASY RYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPTFGQGTKEIK KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLSVDRS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTTLVTVSSGGGSELV TQEPSTLVSPGGTTLTLCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKR PGTPARFSGSLGGAALTLVSGVQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTKLTVLG ATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLVTVSSGTAE AASASGLSGRSDNHSPLG
		ASASGLSGRSDNHSPLG
AC1521	CEA	DIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVGTSAVWYQKPKGAPKLLIYWST RHTGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQQYSLYRSFGQGTKEIK GATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCS ASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPSSTINYAPSLKDRFTISRDNK NTLFLQMDSLRPEDTGVIYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPTVTVSSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQKPKGAPKLLIYYTSRLES PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGATP PETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY SFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARSYYGSDSWYFDVWGQGTTLVTVSSGTAEASASGL SGRSDNHSPLG
AC1522	PSMA	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVGTAVDWYQKPGPSPKLLIYWAST RHTGIPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFPGPGTKVDI KGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVQSGPEVKKPGATVKISC KTSGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEKATLTVDKS TDTAYMELSSLRSEDYAVYYCAAGWNFDYWGQGTLLTVSSGGGSDIQMTQSP SSLSASVGDVRTITCRASQDIRNYLNWYQKPKGAPKLLIYYTSRLESQVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKEIKGATPPET GAETESPGETTGGSAESEPPGEQEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYST GYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSYYGSDSWYFDVWGQGTTLVTVSSGTAEASASGLSGR SDNHSPLG

Таблица 14

Последовательности, кодирующие конструкции химерного полипептидного комплекса

ID конструк- ции	Мишени опухолей	Последовательности ДНК
AC1476	ЕрСАМ	gatattcagatgacccaatcgccgtcgctccctgtcagcttcagtcggtgatcg tgttaccattacctgtcgctcaacgaaatccctgctgcattcaaacggtatta cctatctgtactggtatcagcaaaaaccgggcaaagcgccgaaactgctgac taccagatgtcgaatctggccagcgggtgtccgtctcgtttttagctctagtgg ttctggcaccgatttcaccctgacgatttcctcactgcaaccggaagactttg caacgtattactgcgctcagaacctggaaatcccgcgtaccttcggtcaaggc acgaaagtcgaaattaaaGGTGCAACGCCCTCCGGAGACTGGTGCTGAACTGA GTCCCCGGGCGAGACGACCGGTGGCTCTGCTGAATCCGAACCACCGGGCGAAG GCcaagtgcactggttcagagcgggtccgggtctggtccaaccgggtggcagt gtgctgatttcctgcgcggtcaggttacacctttacgaactatggcatgaa ttgggtgaaacaggccccgggtaaaaggcctggaatggatgggttggatcaaca cctacacgggccaatctacctatgcagatagtttcaaaggccgctttaccttc agcctggacacgtctgctagtgcagcttatctgcagattaatagcctgctg ggaagatacggcgttttattactgtgctgcttttgcaatcaaaggcgactact ggggccaaggcacctgctgacctgtcctccGGTGGTGGCGGCAGCGACATC CAAATGACCCAGAGCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGACCGTGTTAC CATCACCTGCCGTGCGAGCCAAGACATCCGTAACCTGAACCTGGTATCAGC AAAAGCCGGGTAAAGCGCCGAAGCTGCTGATCTACTATACCAGCCGCTCTGGAG AGCGGCGTGCCGAGCCGTTTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACCCCT GACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTCGCGACCTACTATTGCCAGCAGG GTAACACCCTGCCGTGGACCTTTGGTCAAGGCACCAAGTTGAGATTAAAGGC GCCACGCCTCCGGAAACTGGTGCTGAGACGGAATCCCCCTGGTGAACCACTGG

		CGGTTCTGCCGAATCTGAACCGCCTGGTGAAGGCGAGGTGCAGCTGGTTGAAA GCGGTGGCGGTCTGGTGCAACCGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCG AGCGGTTACAGCTTTACCGGTTATACCATGAACCTGGGTTTCGTCAAGCGCCAGG TAAAGGTCTGGAGTGGGTGGCGCTGATCAACCCGTACAAGGGTGTAGCACCT ATAACCAGAAAGTTCAAAGACCGTTTACCATTAGCGTGGATAAGAGCAAAAAC ACCGCGTACCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAGGACACCGCTGTGTACTA TTGCGCGCGTAGCGGTTACTATGGCGACAGCGACTGGTATTTTGTGTGTGGG GCCAAGGCACCTGGTTACCGTGAGCTCCGGCACCGCCGAAGCAGCTAgcgcc tctGGCctgTCaggtCGTtctGATaacCATtccCActgGGTctgGCTGGGTCT TCCAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAAT CCGCTACTCCAGAATCCGGTCCTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTTCT GCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCA GTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAG CCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTCTCTGGTTC TGAAACTCCAGGTTTACCAGCGGGTAGCCGACGAGCAGGAGGAAGGTACCT CTGAGTCGGCCACTCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCAGCCGAGCGAGCG GGTTCAGCCCCGGGTACCAGCACGAGCGCTCCGAGGGTAGCGGTAAGGTTCT TCCGGCGGGCTCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCG AGGGCAGCGCGCCAGGCACCAGCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGC ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAG CGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCAGAACTCTGGCCCG GTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCA AGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTCTCCGCTCC TGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCAGGCACCTCTGAAAGCG CTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCGAAGGAA GAAGGCACCTCTGAGTCTGCTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACCTGC TACCTCTGGTTCCGAAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTG GCCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACT GAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACCGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTCT TGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCCAGCACCAGGTACTAGCA CGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCCTCGGAGGGT AGCGCTCCAGGTAGCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAG CACCAGCCGTCCGAAGGTTCCGCACCAGGTACAGCGAGAGCGCGACTCCTG AATCTGGTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAGCGGTTCTGAGACGCCGGGCACT TCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTCCAGAGCCGGCGACGAGCGG TTCGGAACGCGCGGTACGTCTGAATCAGCCACGCGGAGTCTGGTCCGGGTA CCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACC CCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGGCGAGGTTCTCCAACCAGCACCGAAGAAGG TTCCCTTGCTGGTAGCCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCC CAACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTCT GGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACCTTCTGAGTCTGC TACTCCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTC CAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCTGAATCCGGTCCTGGTCTGAACCACTG ACTTCCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGG TCCTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTG GTAGCCCGACGAGCACGGAGGAGGTACGTCTGAATCTGCAACGCCGGAATCG GGCCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGCTCTGGCAGCGAAACCCGGGTACCTCCGA ATCTGCTACACCGGAAAGCGGTCTGGCAGCCCTGCTGGTTCTCCAACCTCTA CCGAGGAGGGTTACCGGCAGGTAGCCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGC ACGGAGCCGAGCGAGGGTAGTGCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGA GAGCGGTCCAGGCACCAGCGAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCAGGTACTT CTGAGAGCGCCACTCCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCGGCCAACCTCCGGC
--	--	---

		TCAGAACTCCTGGTTCGGAACCGAGCGACCGGTTCTGAAACTCCGGGTAG CCCCGAGGCAGCCCAACGAGCACCAGAGGGTACCAGCACGGAACCGAGCG AGGGTTCTGCCCCGGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT AGCGAACCTGCGACGTCTGGTTCTGAAACGCCGGGTACCAGCGAAAGCGCTAC CCCAGAAATCCGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGCAACAG GTCACCATCATCACCATCAC
AC1516 (кодон- оптимиз согласно DNA2 0)	EpCAM	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTTCCCTGTCCGCATCCGTCGGCGATCG TGTCACGATTACCTGTGCGAGCACTAAGAGCCTGCTGCACTCAAACGGTATCA CGTACCTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCGGGCAAAGCGCCGAAGCTGCTGATT TATCAGATGAGCAACCTGGCATCGGGCGTGCCGAGCCGTTTCAGCAGCAGCGG TAGCGGTACCGACTTCACGCTGACCATCAGCTCGTTGCAGCCAGAGGACTTTG CGACGTACTATTGTGCGCAAACTTGAAATTCGCGCACCTTCGCGCCAGGGT ACGAAAGTTGAGATTAAAGGTGCCACCCACCGGAGACTGGTGAGAAACCGA GTCTCCGGGCGAAACCACGGGCGGTAGCGGGAGAGCGAACCCTGGTGAGG GTCAAGTTCAATTGGTTCAGAGCGGTCCGGGTCTGGTTCAACCGGGCGGAGC GTGCGCATTTCTGTGCGGCCAGCGGTTACACCTTTACGAACTACGGGTATGAA TTGGGTGAAACAAGCTCCGGGCAAAGGTCTGGAGTGGATGGGTTGGATCAATA CCTATACCGGTGAATCCACTTACGCGGATTCTTTAAGGCGCGTTTCACCTTC AGCCTGGACACGAGCGCGAGCGCTGCATATCTGCAAAATCAATAGCCTGCGTGC CGAAGATACCGCGGTGACTATTGCGCGCGTTTTCGAATCAAGGCGACTATT GGGGTCAAGGCACGCTGCTGACCGTGAGCAGCGGTGGTGGCGGCAGCGATATC CAAATGACCCCAATCCCCATCCTCCCTGTCTGCAAGCGTTGGTGATCGTGTGAC GATTACGTGCCGTGCCCTCCCAAGATATCCGTAACCTGAATTTGGTATCAGC AGAAACCGGGCAAGGCTCCGAAATTGCTGATCTACTACACCGAGCGCCTGGAG TCGGGTGTGCCGTAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGTTCCGGTACCAGCTATACCTT GACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTCGCGACGTATTACTGCGCAACAGG GTAACACGCTGCCGTGGACCTTTGGCCAAGGTACCAAAGTCGAGATTAAAGGT GCGACCCCGCCGGAACCGGTGCGGAAACCGAGAGCCCGGGTGAACGACTGG CGGCTCTGCAGAGAGCGAGCCGCGAGGTGAGGGCGAAGTCCAAGTGGTCGAGT CTGGTGGCGGCTGGTGCAACCGGGTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCTGCG AGCGGCTATAGCTTTACCGGTTATACCATGAAGTGGGTTCCGCGAGGCACCGGG TAAGGGTCTGGAATGGGTGGCGCTGATCAATCCGTACAAGGTGTGAGCACTT ACAATCAGAAATTCAAAGACCGTTTACCATTAGCGTTGACAAGCAAGAAT ACCGCGTATCTGCAGATGAACAGCTTGCGCGCGGAGGATACGGCCGTTTACTA CTGTGCAGTAGCGGCTATTACGGTGACAGCGACTGGTACTTTGACGTCTGGG GTCAGGGCACGCTGGTCACCGTTAGCAGCGGCACCGCGAAGCAGCTAgcgcc tctGGCctgTCAggtCGTtctGATaacCATtcccActgGGTctgGCTGGGTCT TCCAGGTAGCCAGCTGGTAGCCCAACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAAT CCGCTACTCCAGAATCCGGTCTTGGTACTAGCACTGAGCCAAGCGAAGGTCTCT GCTCCAGGCTCCCCGGCAGGTAGCCCTACCTCTACCGAAGAGGGCACTAGCAC CGAACCATCTGAGGGTTCCGCTCCTGGCACCTCCACTGAACCGTCCGAAGGCA GTGCTCCGGGTACTTCCGAAAGCGCAACTCCGGAATCCGGCCCTGGTTCTGAG CCTGCTACTTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTAGCGAGCCAGCGACTTCTGGTTCT TGAAACTCCAGGTTACCGGGCGGGTAGCCCGACGAGCACGGAGGAAGGTACCT CTGAGTCGGGCACTCCTGAGTCCGGTCCGGGCACGAGCACCAGCCGAGCGAG GGTTCAGCCCCGGGTACCAGCACGGAGCCGTCCGAGGGTAGCGCACCGGGTTC TCCGGCGGGCTCCCCTACGTCTACGGAAGAGGGTACGTCCACTGAACCTAGCG AGGGCAGCGCGCCAGGCACCACTGAACCGAGCGAAGGCAGCGCACCTGGC ACTAGCGAGTCTGCGACTCCGGAGAGCGGTCCGGGTACGAGCACGGAACCAAG CGAAGGCAGCGCCCCAGGTACCTCTGAATCTGCTACCCCAAGATCTGGCCCCG GTTCCGAGCCAGCTACCTCTGGTTCTGAAACCCAGGTACTTCCACTGAACCA AGCGAAGGTAGCGCTCCTGGCACTTCTACTGAACCATCCGAAGGTTCCGCTCC TGGTACGTCTGAAAGCGCTACCCCTGAAAGCGGCCACGACCTCTGAAAGCG

	CTACTCCTGAGAGCGGTCCAGGCTCTCCAGCAGGTTCTCCAACCTCCACTGAA GAAGGCACCTCTGAGTCTGTACCCCTGAATCTGGTCTGGCTCCGAACCTGC TACCTCTGGTTCCGAACTCCAGGTACCTCGGAATCTGCGACTCCGGAATCTG GCCCCGGGCACGAGCACGGAGCCGTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCAGCACT GAGCCTTCTGAGGGCTCTGCACCGGTACCTCCACGGAACCTTCGGAAGGTTTC TGCGCCGGGTACCTCCACTGAGCCATCCGAGGGTTCAGCACCAGGTACTAGCA CGGAACCGTCCGAGGGCTCTGCACCAGGTACGAGCACCGAACCTCGGAGGGT AGCGCTCCAGGTAGCCCAGCGGGCTCTCCGACAAGCACCGAAGAAGGCACCAG CACCGAGCCGTCCGAAGGTTCCGACACCAGGTACAGCGAGAGCGCGACTCCTG AATCTGGTCCGGGTAGCGAGCCTGCAACCAGCGGTCTGAGACGCCGGGCACT TCCGAATCTGCGACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTTACAGAGCCGGCGACGAGCGG TTCGGAACGCGCGGTACGTCTGAATCAGCCACGCGGAGTCTGGTCCGGGT CCTCGACCGAACCAAGCGAAGGTTCCGGCACCGGGTACTAGCGAGAGCGCAACC CCTGAAAGCGGTCCGGGCAGCCCGCAGGTTCTCCAACAGCACCGAAGAAGG TTCCCCTGCTGGTAGCCGACCTCTACGGAGGAAGGTAGCCCTGCAGGTTCCC CAACTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAGTCCGCTACCCAGAAAGCGGTCTCT GGTACCTCCACTGAACCGTCTGAAGGCTCTGCACCAGGCACTTCTGAGTCTGC TACTCTCAGAAAGCGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTTCTGGCTCTGAGTCTG CAGGCACTTCTGAGTCCGCAACGCTGAATCCGGTCTGGTCTGAACCAGCT ACTTCCGGCAGCGAAACCCAGGTACCTCTGAGTCTGCGACTCCAGAGTCTGG TCCTGGTACTTCCACTGAGCCTAGCGAGGGTTCGCGACCCAGGTTCTCCGGCTG GTAGCCCGACGACGAGGAGGAGGTACGTCTGAATCTGCAACGCCGGAATCG GGCCCAGGTTCCGAGCCTGCAACGTCTGGCAGCGAAACCCCGGTACCTCCGA ATCTGTACACCGGAAGCGGTCTGGCAGCCCTGCTGGTCTCCAACCTCTA CCGAGGAGGGTTCACCGGCAGGTAGCCGACTAGCACTGAAGAAGGTACTAGC ACGGAGCCGAGCGAGGTAAGTGTCTCCGGGTACGAGCGAGAGCGCAACGCCAGA GAGCGGTCCAGGCACCGCAATCGGCCACCCCTGAGAGCGGCCAGGTAATTT CTGAGAGCGCCACTCTGAATCCGGCCCTGGTAGCGAGCCGGCACTCCGGC TCAGAACTCCTGGTTCGGAACCGAGCAGCAGCGGTCTGAACTCCGGGTAG CCCGGCAGGCAGCCCAACGAGCAGCGAAGAGGTTACGAGCAGCGAACCGAGCG AGGGTCTGCCCCGGTACTTCCACCGAACCATCGGAGGGCTCTGCACCTGGT AGCGAACCTGCGACGTCTGGTCTGAAACGCCGGGTACCGAGCGAAAGCGCTAC CCCAGAACTCCGGTCCGGGCACTAGCACCAGCCATCGGAGGGCTCCGCACCAG GTCACCATCATCACCATCAC
--	--

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный полипептидный комплекс для лечения рака или опухоли у субъекта, содержащий первую часть, вторую часть и третью часть, где:

(а) указанная первая часть представляет собой полипептид, содержащий:

1) первый связывающий домен со специфичностью связывания с опухолеспецифическим маркером;

и

2) второй связывающий домен со специфичностью связывания с антигеном Т-клетки;

(б) указанная вторая часть содержит пептидный отделяемый сегмент (RS), способный расщепляться одной или несколькими протеазами млекопитающих; и

(в) указанная третья часть содержит объемную группировку, представляющую собой удлиненный рекомбинантный полипептид (XTEN);

при этом указанная объемная группировка способна отделяться от указанной первой части под действием указанной протеазы млекопитающих на указанную вторую часть,

где, в направлении от N-конца к С-концу, первая часть присоединена ко второй части, которая в свою очередь присоединена к третьей части, или третья часть присоединена ко второй части, которая в свою очередь присоединена к первой части.

2. Химерный полипептидный комплекс по п.1, где, в направлении от N-конца к С-концу, первая часть присоединена ко второй части, которая в свою очередь присоединена к третьей части.

3. Химерный полипептидный комплекс по п.1, где, в направлении от N-конца к С-концу, третья часть присоединена ко второй части, которая в свою очередь присоединена к первой части.

4. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-3, где протеаза млекопитающих экспрессирована в опухолевой ткани.

5. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-4, где каждый из первого связывающего домена и второго связывающего домена представляет собой scFv (одноцепочечный Fv).

6. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-5, где второй связывающий домен обладает специфичностью связывания с антигеном Т-клетки, экспрессированным на Т-клетке, выбранной из группы, состоящей из Т-клетки, регуляторной Т-клетки (RegT-клетки) и хелперной Т-клетки.

7. Химерный полипептидный комплекс по п.6, где антиген Т-клетки представляет собой CD3 (кластер дифференцировки 3) или CD3ε.

8. Химерный полипептидный комплекс по п.7, где второй связывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и/или вариабельную область тяжелой цепи (VH), происходящие из моноклонального антитела, способного связываться с CD3 или CD3ε человека.

9. Химерный полипептидный комплекс по п.7, где VL и/или VH второго связывающего домена имеет последовательность, выбранную из группы последовательностей, приведенных в табл. 1.

10. Химерный полипептидный комплекс по п.8 или 9, где второй связывающий домен представляет собой scFv, и где VH- и VL-области расположены в порядке VH-VL или VL-VH в направлении от N-конца к С-концу.

11. Химерный полипептидный комплекс по п.7, где второй связывающий домен содержит участок CDR-H1 (определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи), участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1 (легкой цепи), участок CDR-L2 и участок CDR-L3, каждый из которых происходит из моноклонального антитела из табл. 1.

12. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-11, где первый связывающий домен содержит VL- и/или VH-область, происходящую из моноклонального антитела, способного связываться с указанным опухолеспецифическим маркером, где VH- и VL-области расположены в порядке VH-VL или VL-VH в направлении от N-конца к С-концу, когда присутствуют обе области.

13. Химерный полипептидный комплекс по п.12, где VH- и VL-области первого связывающего домена происходят из VH и VL моноклонального антитела, выбранных из группы последовательностей, приведенных в табл. 2.

14. Химерный полипептидный комплекс по п.12, где первый связывающий домен представляет собой scFv, где VH- и VL-области расположены от N-конца к С-концу в форме VH-VL или VL-VH.

15. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-11, где первый связывающий домен способен связываться с опухолеспецифическим маркером и содержит участок CDR-H1, участок CDR-H2, участок CDR-H3, участок CDR-L1, участок CDR-L2 и участок CDR-L3, где каждый из указанных участков происходит из последовательностей моноклонального антитела, приведенных в табл. 2.

16. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-15, где опухолеспецифический маркер выбран из группы, состоящей из альфа-4-интегрина, Ang2 (ангиопоэтин 2), B7-H3 (гомолог 3 семейства B7), B7-H6 (гомолог 6 семейства B7), CEACAM5 (родственная карциноэмбриональному антигену молекула 5 клеточной адгезии), cMET, CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4), FOLR1 (рецептор 1 фолиевой кислоты), EpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), CCR5 (хемокиновый рецептор 5 семейства CC), CD19 (кластер дифференцировки 19), HER2 (рецептор эпидермального фактора роста 2 типа у людей), HER2 neu (HER2 у грызунов), HER3, HER4, HER1 (EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)), PD-L1 (лиганд 1 белка программируемой (клеточной) смерти), PSMA (мембранный антиген предстательной железы), CEA (карциноэмбриональный антиген), MUC1 (муцин), MUC-2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC16, β hCG (хорионический гонадотропин-бета человека), антигена Y Льюиса, CD20, CD33, CD38, CD30, CD56 (NCAM (молекула адгезии нервных клеток)), CD133, ганглиозида GD3, 9-О-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, GD2, карбоангидразы IX, CD44v6, продукта гена "звуковой еж" (Shh), Wue-1, антигена 1 плазматических клеток, хондроитин-сульфат-протеогликана меланомы (MCSP), CCR8, антигена эпителиальных клеток предстательной железы с 6-ю трансмембранными сегментами (STEAP), мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6, десмоглеина 4, фетального ацетилхолинового рецептора (fnAChR), CD25, ракового антигена 19-9 (CA19-9), ракового антигена 125 (CA-125), рецептора II типа ингибирующего вещества Мюллера (MISIIR), сialiрированного антигена Tn (sTN), антигена - белка активации фибробластов (FAP), эндосиалина (CD248), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), опухолассоциированного антигена L6 (TAL6), SAS (поверхностный белок *Staphylococcus aureus*), CD63, TAG72 (опухолассоциированный гликопротеин 72), антигена Томсена-Фриденрайха (антигена TF), рецептора инсулиноподобного ростового фактора I (IGF-IR), антигена Cora, CD7, CD22, CD70, CD79a, CD79b, G250, MT-MMP (матриксные металлопротеиназы мембранного типа), антигена F19, CA19-9, CA-125, альфафетопротейна (AFP), VEGFR1 (рецептор 1 сосудистого эндотелиального фактора роста), VEGFR2, DLK1, SP17, ROR1 (орфанный рецептор 1, родственник рецептору ретиноевой кислоты) и EphA2 (рецептор эфрина A2).

17. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.5-16, где первый связывающий домен и второй связывающий домен соединены гибким полипептидным линкером, выбранным из группы последовательностей, приведенных в табл. 8 и 9.

18. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-17, где RS содержит аминокислотную последовательность, способную расщепляться под действием одной или более протеаз, выбранных из группы, состоящей из протеаз, приведенных в табл. 3.

19. Химерный полипептидный комплекс по п.18, где RS представляет собой субстрат для легумина, MMP-2 (матриксная металлопротеиназа-2), MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA (активатор урокиназного плазминогена) и матриптазы.

20. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-19, где RS содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в табл. 4.

21. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-20, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 5.

22. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-21, где первая часть химерного поли-

пептидного комплекса содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, приведенных в табл. 13.

23. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.16-22, где, в результате расщепления второй части под действием указанной протеазы млекопитающих и высвобождения первой части из химерного полипептидного комплекса, первая часть способна одновременно связываться с Т-клеткой, несущей антиген Т-клетки, и с опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер, в анализе *in vitro* с использованием указанных Т-клетки и опухолевой клетки.

24. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где, в результате расщепления второй части с высвобождением указанной первой части и указанной третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса, указанная высвободившаяся первая часть имеет молекулярную массу по меньшей мере в 2, 3, 4 или 5 раз меньше, чем указанной высвободившейся третьей части.

25. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где, в результате расщепления второй части, указанная первая часть, высвободившаяся из указанного химерного полипептидного комплекса, имеет более высокую аффинность связывания с антигеном Т-клетки или с опухолеспецифическим маркером по сравнению с химерным связывающим комплексом, в котором вторая часть не расщеплена.

26. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где аффинность связывания высвободившейся первой части с антигеном Т-клетки, или с опухолеспецифическим маркером по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или в 10 раз выше по сравнению с аффинностью связывания химерного полипептидного комплекса с антигеном Т-клетки или с опухолеспецифическим маркером, где RS не расщеплен.

27. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где одновременное связывание первой части с Т-клеткой и с опухолевой клеткой приводит к цитотоксической активности в отношении опухолевой клетки в анализе *in vitro*.

28. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где высвободившаяся первая часть химерного полипептидного комплекса способна осуществлять клеточный лизис опухолевой клетки на более высоком уровне по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом в анализе *in vitro*.

29. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где уровень клеточного лизиса, вызываемого высвободившейся первой частью химерного полипептидного комплекса, по меньшей мере в 10 раз выше, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 300 раз, или по меньшей мере в 1000 раз выше по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом в анализе *in vitro*.

30. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.27-29, где цитотоксическая активность и/или клеточный лизис опухолевой клетки опосредован мишень-специфической активацией Т-клетки.

31. Химерный полипептидный комплекс по п.30, где количество активированных Т-клеток, образуемых посредством высвободившейся первой части химерного полипептидного комплекса, по меньшей мере в 10 раз выше, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 300 раз, или по меньшей мере в 1000 раз выше по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом.

32. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.27-31, где при сравнении:

а) относительной цитотоксичности, которую измеряют как соотношение между цитотоксичностью (1) высвободившейся первой части по отношению к опухолевой клетке в анализе *in vitro* с использованием как Т-клеток, несущих антиген Т-клетки, так и опухолевых клеток, несущих опухолеспецифический маркер, и цитотоксичностью (2) композиции, содержащей соответствующую первую часть химерного полипептидного комплекса и соответствующую третью часть химерного полипептидного комплекса, соединенные посредством нерасщепляемого пептида, содержащего от 1 до примерно 10 аминокислот; и

б) относительной аффинности связывания, которую измеряют как соотношение аффинности связывания второго связывающего домена высвободившейся первой части, указанной в (а1), с антигеном Т-клетки и аффинности связывания композиции, указанной в (а2), с антигеном Т-клетки, соотношение между относительной цитотоксичностью и относительной аффинностью связывания превышает по меньшей мере 10:1, или превышает по меньшей мере 30:1, или превышает по меньшей мере 50:1, или превышает по меньшей мере 100:1, или превышает по меньшей мере 300:1, или превышает по меньшей мере 500:1, или превышает по меньшей мере 1000:1.

33. Химерный полипептидный комплекс по п.32, где нерасщепляемый пептид имеет последовательность глицин-серин и антиген Т-клетки представляет собой CD3 или CD3ε.

34. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.32, 33, где анализ *in vitro* выбран из группы анализов, состоящей из анализа целостности клеточной мембраны, анализа в смешанной культуре клеток, метода сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), основанного на анализе иодида пропидия, анализа проникновения трипанового синего, фотометрического анализа высвобождения ферментов, радиометрического анализа высвобождения ⁵¹Cr, флуориметрического анализа высвобождения европия, анализа высвобождения кальцеина АМ (ацетоксиметилкальцеина), фотометрического анализа содержания МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид), анализа содержания ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид), анализа содержания

WST-1 (водорастворимая тетразолиевая соль-1), анализа с использованием аламарового синего, радиометрического анализа встраивания ^3H -Thd (тимидин), оценки клоногенности с измерением активности деления клеток, флуориметрического анализа содержания родамина-123 с измерением трансмембранного градиента митохондриальной мембраны, анализа апоптоза с мониторингом экспонирования фосфатидилсерина посредством FACS, анализа с использованием теста TUNEL (ник-концевое мечение дезоксиуридинтрифосфатом(дУТФ)-биотином, опосредованное терминальной дезоксинуклеотидил-трансферазой (TdT)), основанного на ELISA (иммуоферментный твердофазный анализ), сэндвич-ELISA, анализа каспазной активности, анализа высвобождения LDH (лактатдегидрогеназа) с применением клеток и морфологического анализа клеток или любой их комбинации.

35. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где аффинность связывания первого связывающего домена высвободившейся первой части с опухолеспецифическим маркером выше, чем аффинность связывания второго связывающего домена высвободившейся первой части с антигеном Т-клетки.

36. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где аффинность связывания первого связывающего домена с опухолеспецифическим маркером, по результатам измерений константы K_d в анализе *in vitro*, по меньшей мере на один порядок выше по сравнению с более высокой аффинностью связывания второго связывающего домена с антигеном Т-клетки.

37. Химерный полипептидный комплекс по п.23, где константа K_d для первого связывающего домена химерного полипептидного комплекса составляет от 10^{-5} до 10^{-9} М, и K_d для второго связывающего домена составляет от 10^{-5} до 10^{-9} М.

38. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-22, где после введения субъекту композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, вторая часть химерного полипептидного комплекса расщепляется вблизи опухоли, экспрессирующей протеазу, способную расщеплять RS, при введении указанного химерного полипептидного комплекса субъекту.

39. Химерный полипептидный комплекс по п.38, где в результате расщепления второй части под действием указанной протеазы млекопитающих и высвобождения первой части из химерного полипептидного комплекса первая часть приобретает способность одновременно связываться с Т-клеткой, несущей антиген Т-клетки, и с опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер.

40. Химерный полипептидный комплекс по п.39, где в результате одновременного связывания первой части с Т-клеткой, несущей антиген Т-клетки, и опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер, происходит высвобождение Т-клеточной эффекторной молекулы.

41. Химерный полипептидный комплекс по п.40, где эффекторная молекула выбрана из одной или более эффекторных молекул из группы, состоящей из TNF- α (альфа-фактор некроза опухоли), IFN- γ (интерферон-гамма), интерлейкина 2, перфорина и гранзимов.

42. Химерный полипептидный комплекс по п.39, где в результате одновременного связывания первой части с Т-клеткой, несущей антиген Т-клетки, и с опухолевой клеткой, несущей опухолеспецифический маркер, осуществляется лизис опухолевой клетки под действием Т-клетки.

43. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.38-42, который демонстрирует период полувыведения после введения субъекту, превышающий по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз период полувыведения первой части, не соединенной с указанными второй и третьей частями, после введения субъекту в сопоставимой дозе.

44. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.38-43, где, после введения химерного полипептидного комплекса субъекту, расщепления второй части и высвобождения указанной первой части и указанной третьей части из указанного химерного полипептидного комплекса, указанная первая часть имеет период полувыведения по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз меньше по сравнению с интактным химерным полипептидным комплексом у субъекта.

45. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.38-44, где максимальная концентрация в плазме крови, C_{max} , высвободившейся первой части после однократного введения субъекту композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, не превышает примерно 0,01 нг/мл, или примерно 0,1 нг/мл, или примерно 1 нг/мл, или примерно 10 нг/мл, или примерно 100 нг/мл.

46. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.38-44, где максимальная концентрация в плазме крови C_{max} высвободившейся первой части после однократного введения субъекту композиции, содержащей химерный полипептидный комплекс, по меньшей мере в 3 раза ниже, или по меньшей мере в 10 раз ниже, или по меньшей мере в 30 раз ниже, или по меньшей мере в 100 раз ниже, чем у интактного химерного полипептидного комплекса у того же субъекта.

47. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.38-46, где интактный химерный полипептидный комплекс демонстрирует более слабую экстравазацию из кровеносной системы субъекта по сравнению с химерным полипептидным комплексом, в котором RS расщеплен с высвобождением первой части и третьей части.

48. Химерный полипептидный комплекс по любому из пп.38-47, где субъект выбран из группы, состоящей из мыши, крысы, обезьяны, собаки и человека.

49. Фармацевтическая композиция в качестве лекарственного средства для лечения рака или опухоли у субъекта, содержащая химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-48 и один или более

фармацевтически приемлемых эксципиентов.

50. Фармацевтическая композиция по п.49, которая находится в жидкой форме.

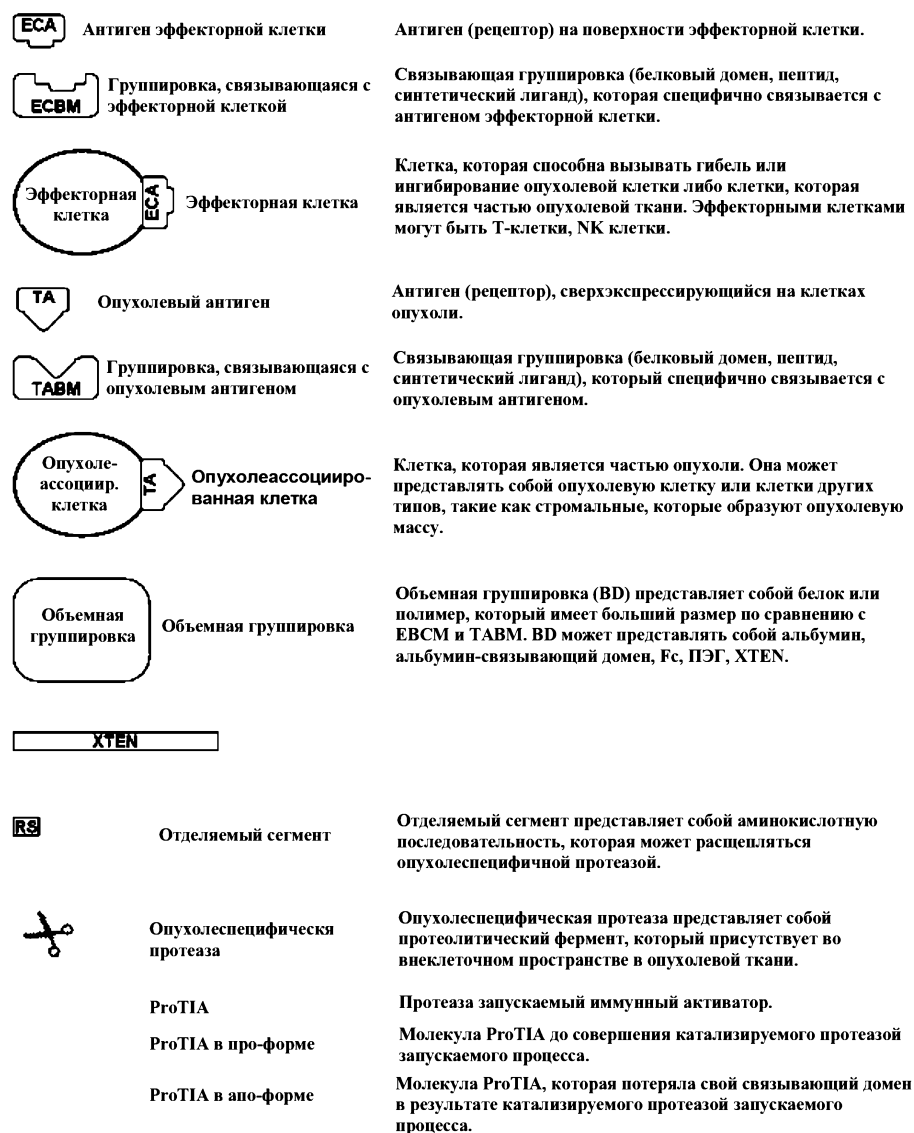
51. Фармацевтическая композиция по п.50, которая находится в предварительно наполненном шприце.

52. Фармацевтическая композиция по п.49, приготовленная в виде лиофилизированного порошка, подлежащего разведению до введения.

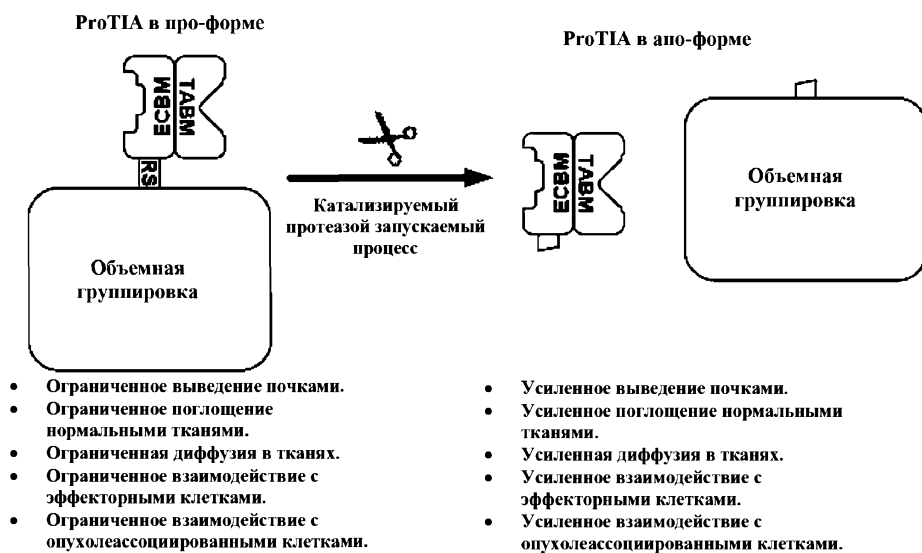
53. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотидную последовательность, выбранную из (а) полинуклеотида, кодирующего химерный полипептидный комплекс по любому из пп.1-48, или (б) последовательности, комплементарной полинуклеотиду из (а).

54. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность по п.53 и рекомбинантную регуляторную последовательность, функционально связанную с данной полинуклеотидной последовательностью.

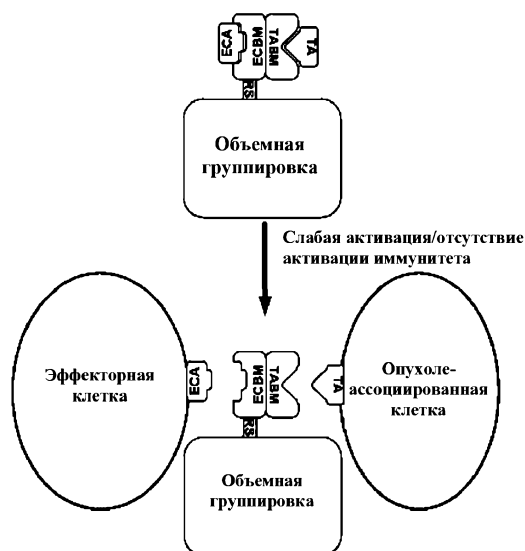
55. Выделенная клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.54, представляющая собой E.coli.



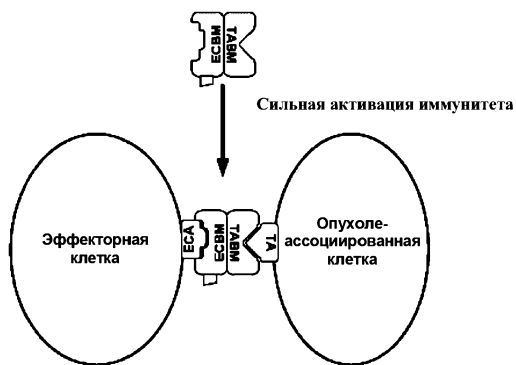
Фиг. 1



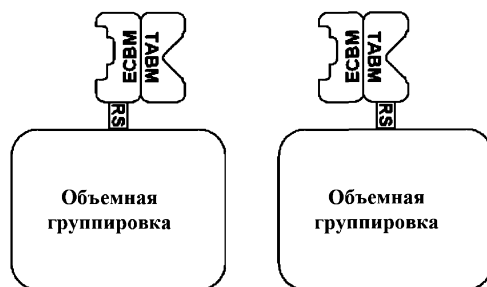
Фиг. 2



Фиг. 3А



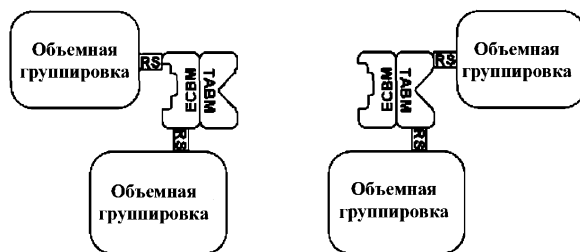
Фиг. 3В



Фиг. 4



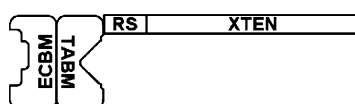
Фиг. 5А



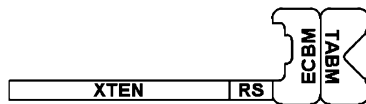
Фиг. 5В



Фиг. 6А



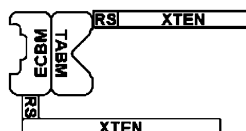
Фиг. 6В



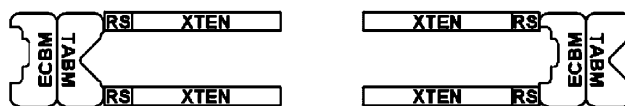
Фиг. 6С



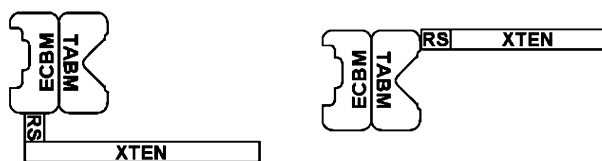
Фиг. 6D



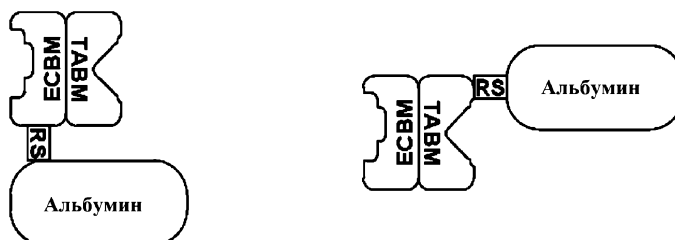
Фиг. 7А



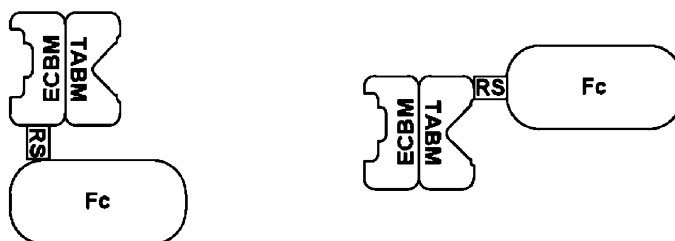
Фиг. 7В



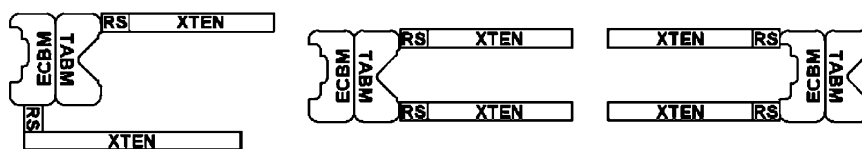
Фиг. 8А



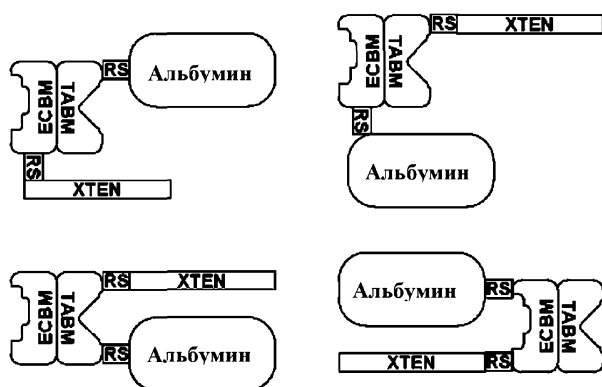
Фиг. 8В



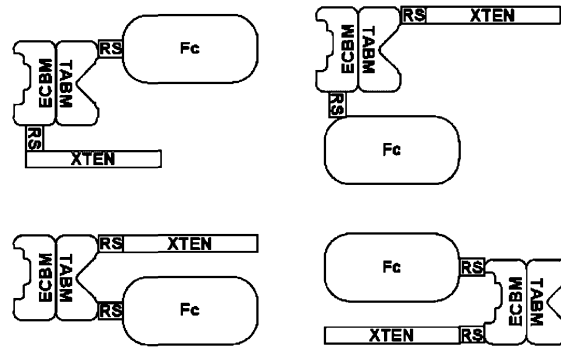
Фиг. 8С



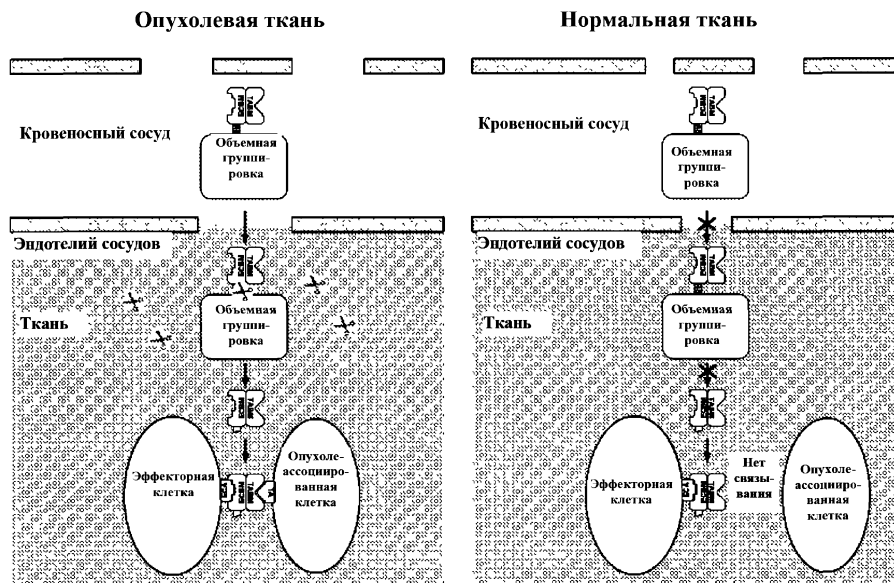
Фиг. 9А



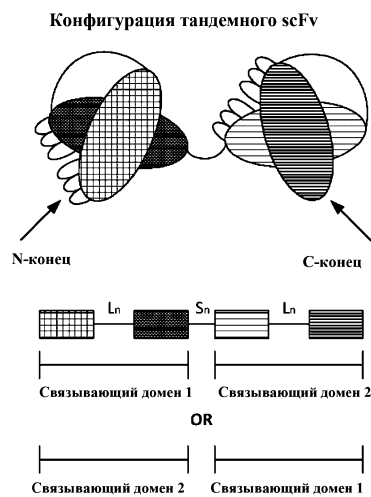
Фиг. 9В



Фиг. 9С

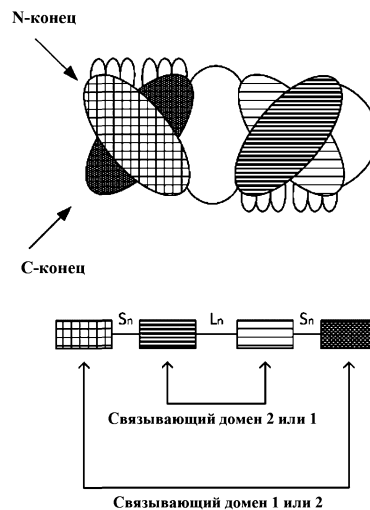


Фиг. 10



Фиг. 11

Конфигурация диатела



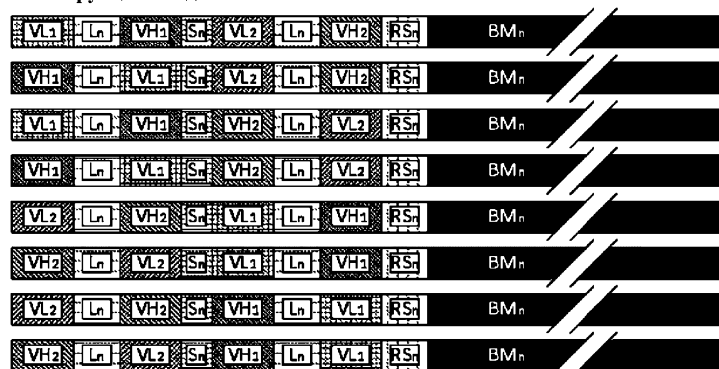
Фиг. 12

Общая структура конструкции



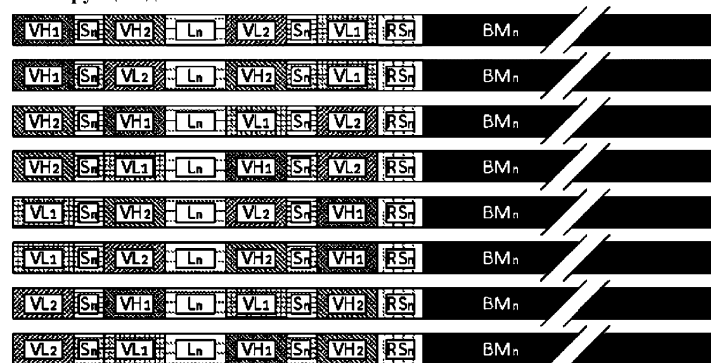
Фиг. 13А

Конструкции тандемных scFv

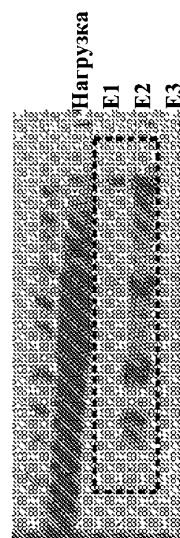


Фиг. 13В

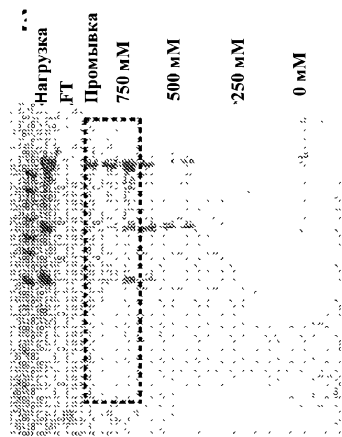
Конструкции диатела



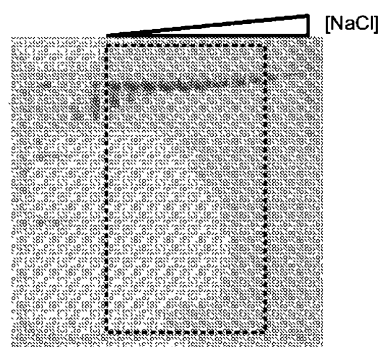
Фиг. 13С



Фиг. 14А

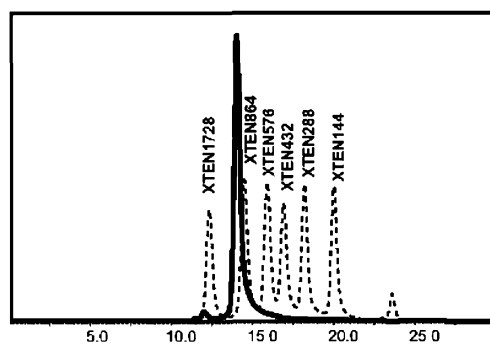


Фиг. 14В



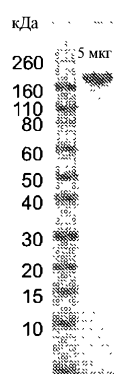
Фиг. 14С

038329

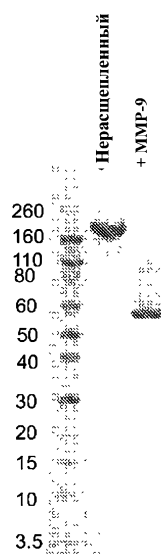


Время удерживания (мин)

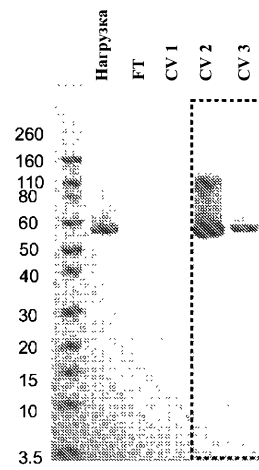
Фиг. 15А



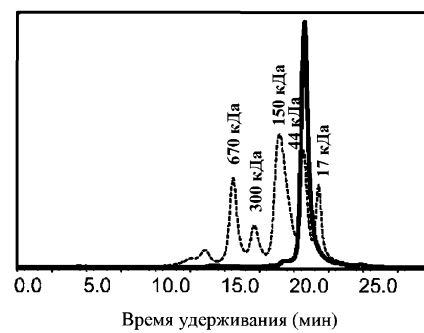
Фиг. 15В



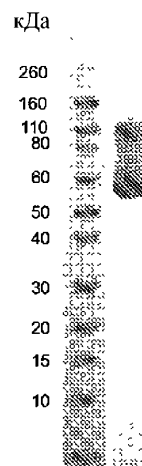
Фиг. 16А



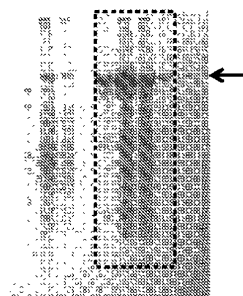
Фиг. 16В



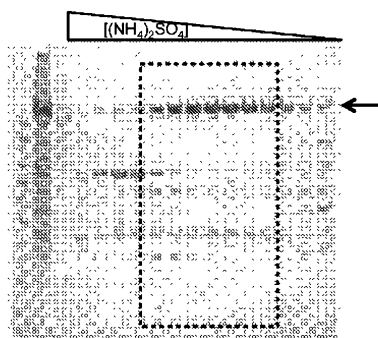
Фиг. 17А



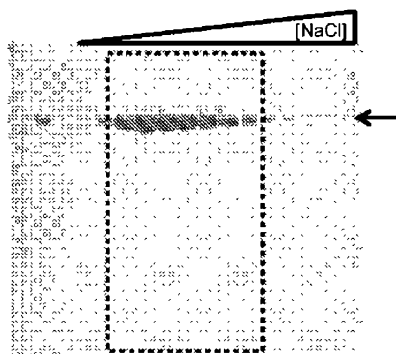
Фиг. 17В



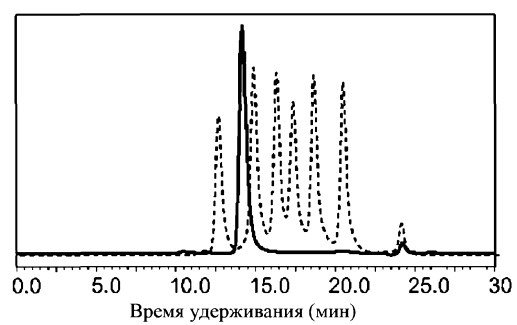
Фиг. 18А



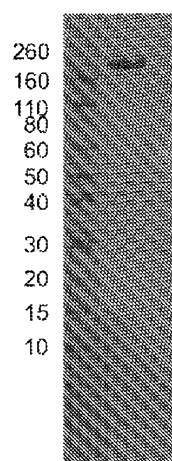
Фиг. 18В



Фиг. 18С

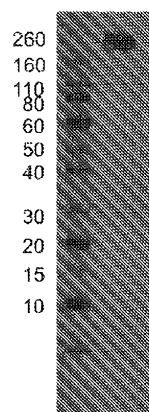


Фиг. 19А

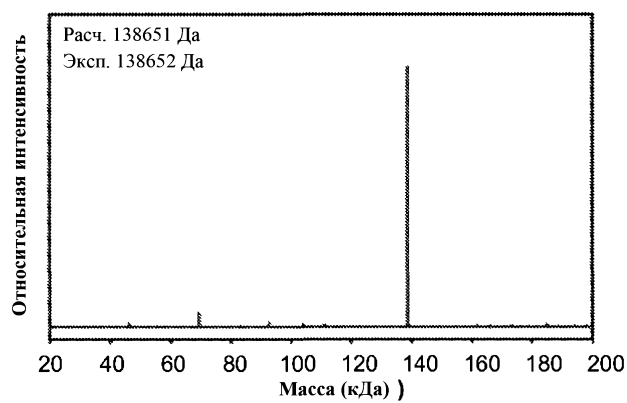


Фиг. 19В

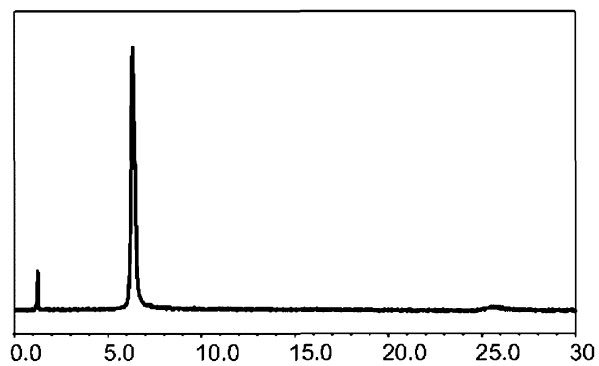
038329



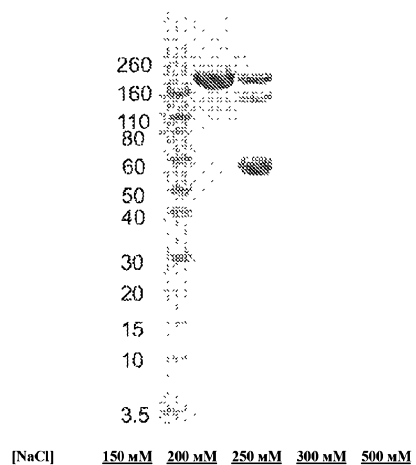
Фиг. 19С



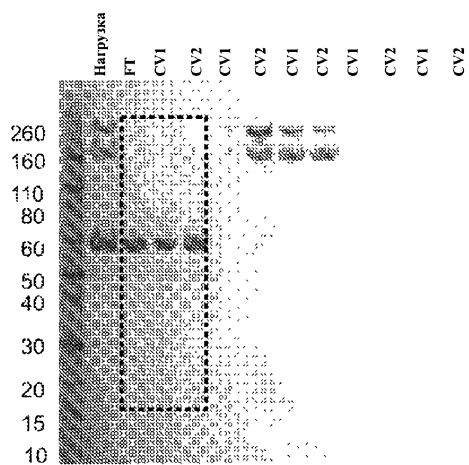
Фиг. 20А



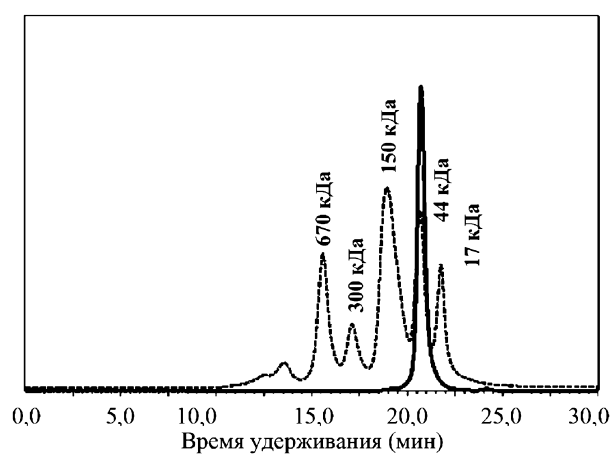
Фиг. 20В



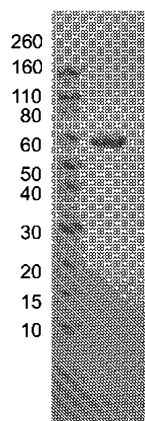
Фиг. 21А



Фиг. 21В

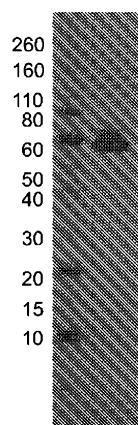


Фиг. 22А

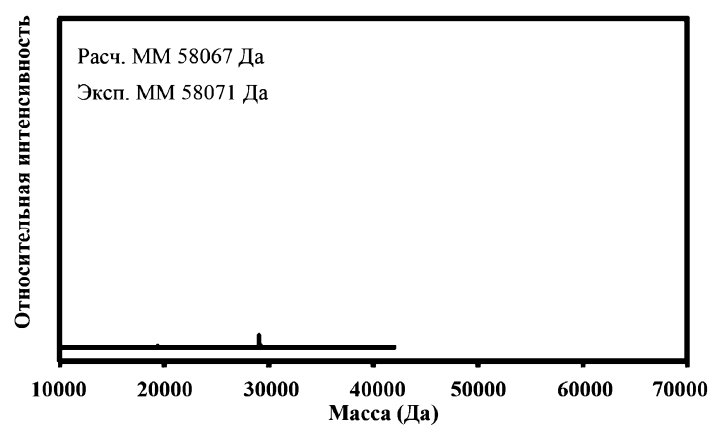


Фиг. 22В

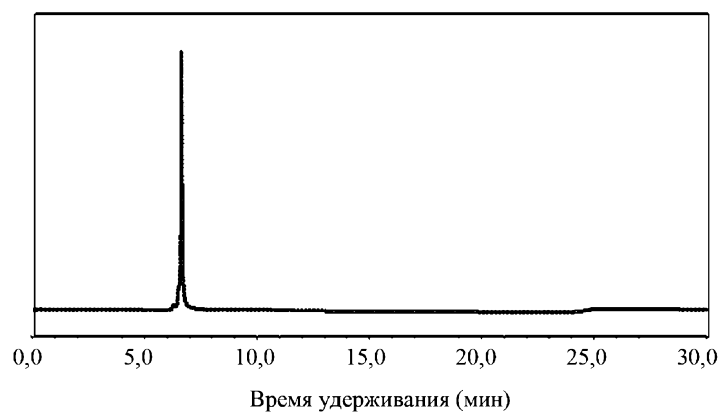
038329



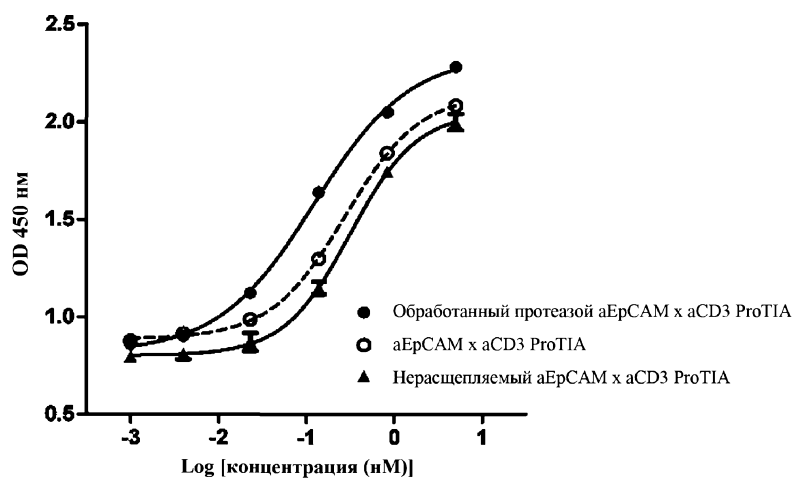
Фиг. 22С



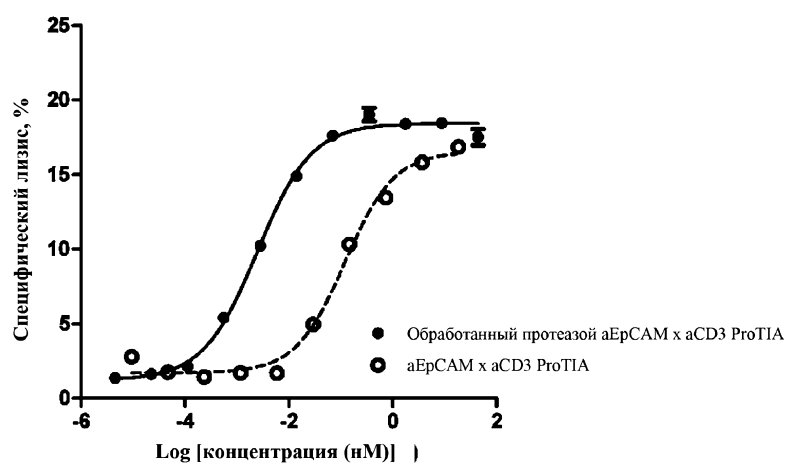
Фиг. 23А



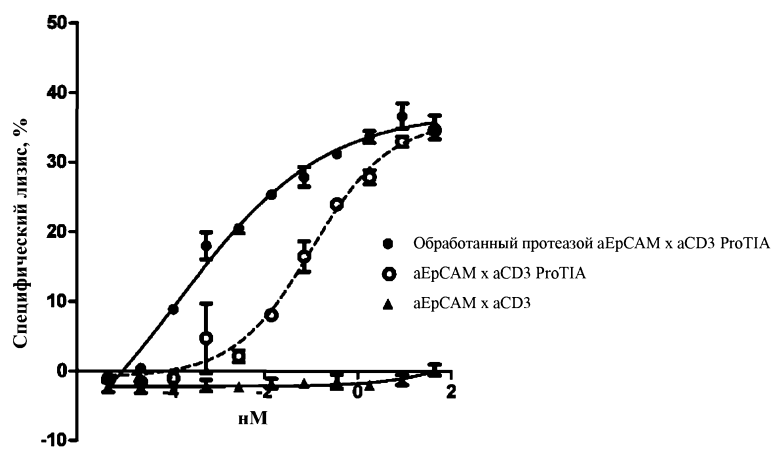
Фиг. 23В



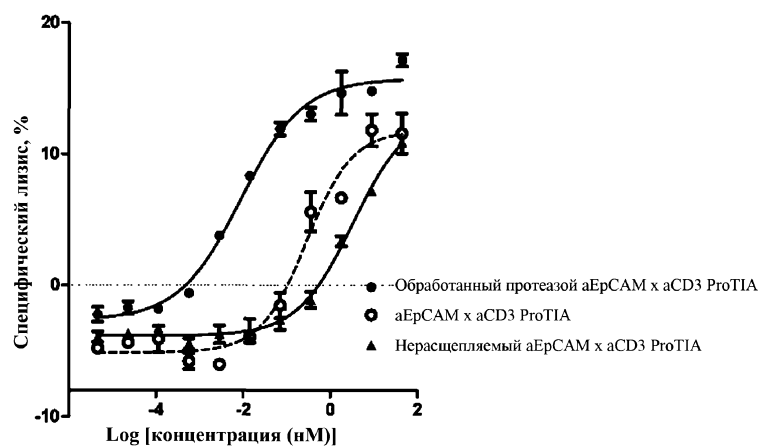
Фиг. 24



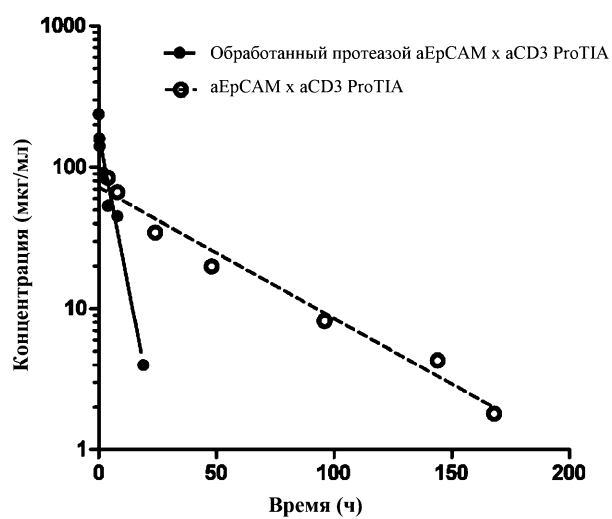
Фиг. 25



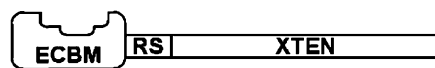
Фиг. 26



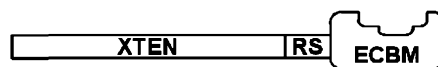
Фиг. 27



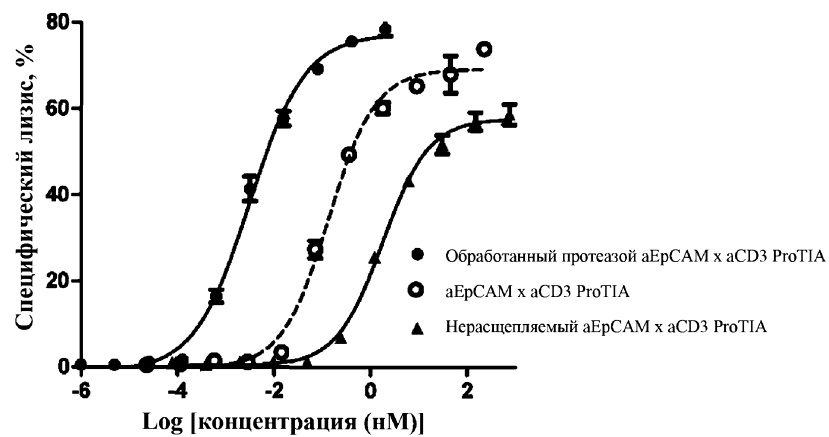
Фиг. 28



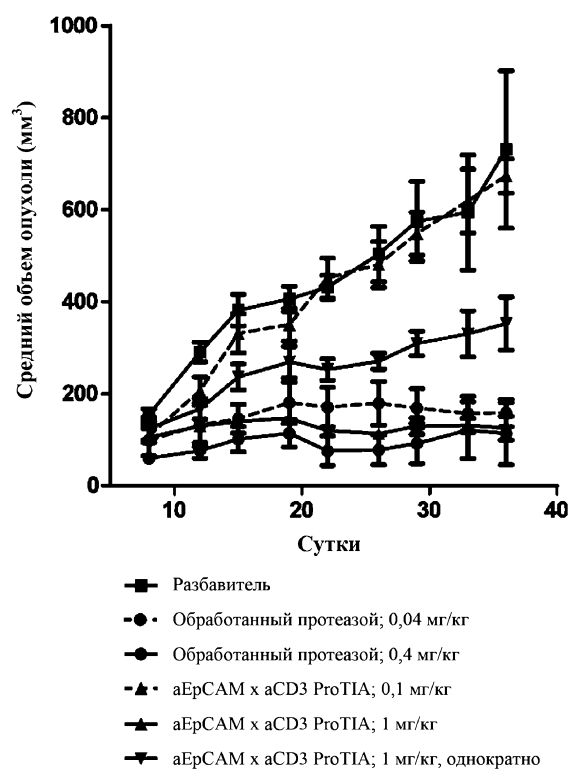
Фиг. 29А



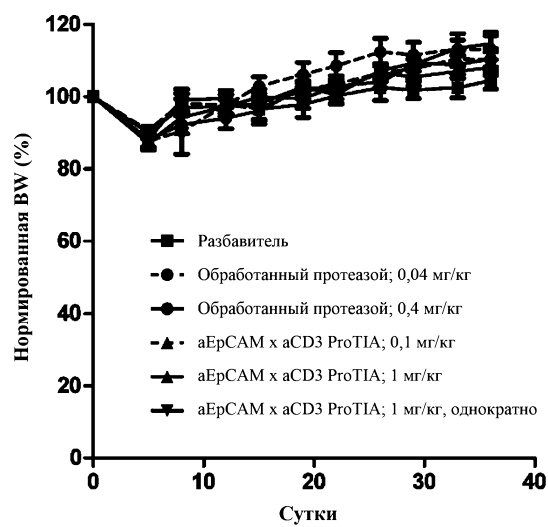
Фиг. 29В



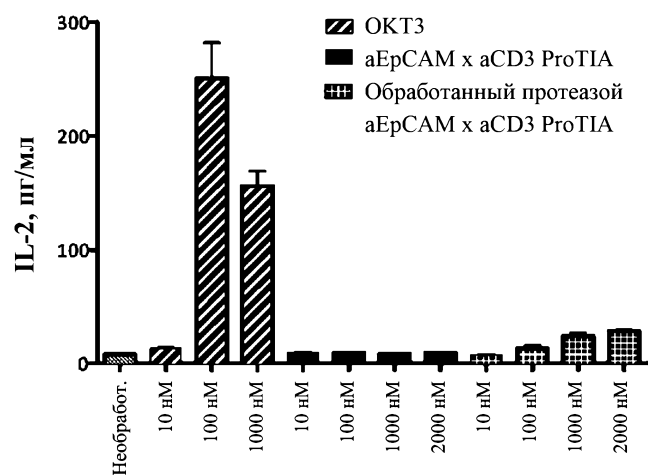
Фиг. 30



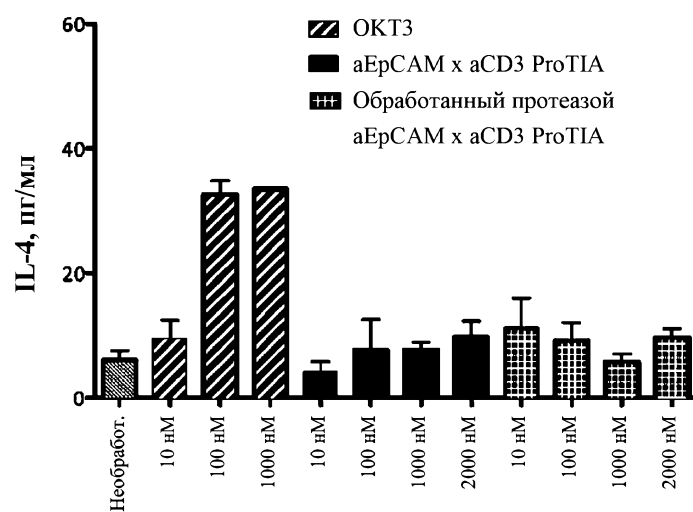
Фиг. 31



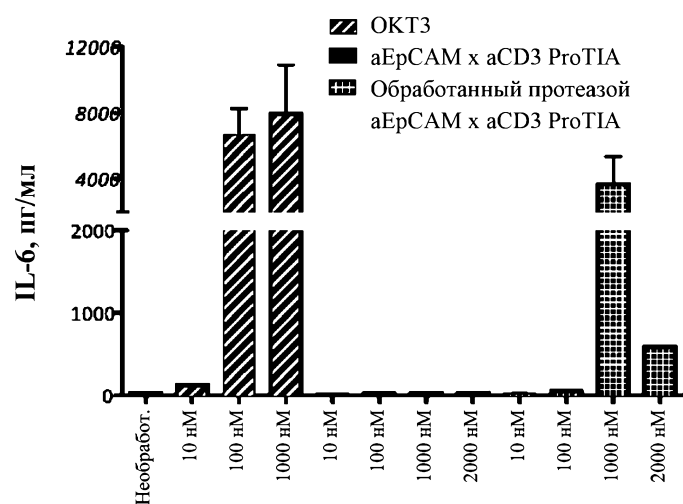
Фиг. 32



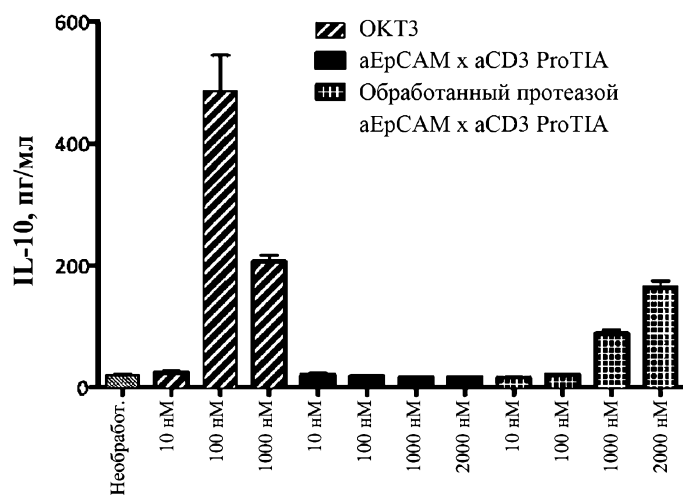
Фиг. 33А



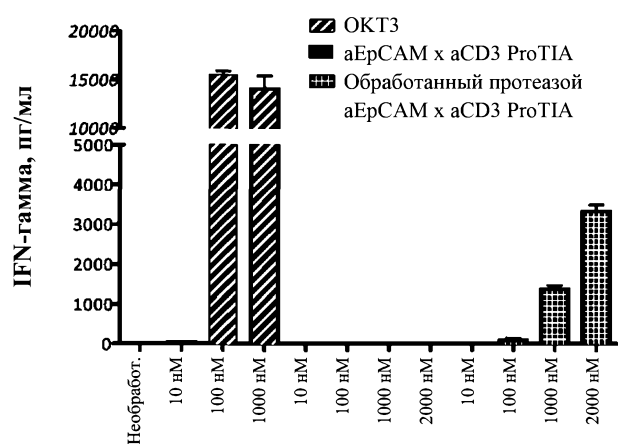
Фиг. 33В



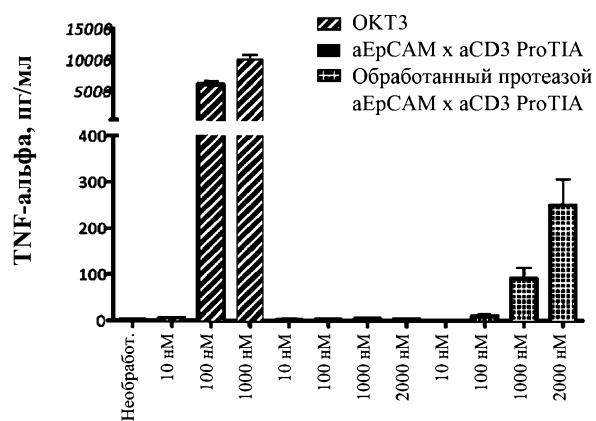
Фиг. 34А



Фиг. 34В



Фиг. 35А



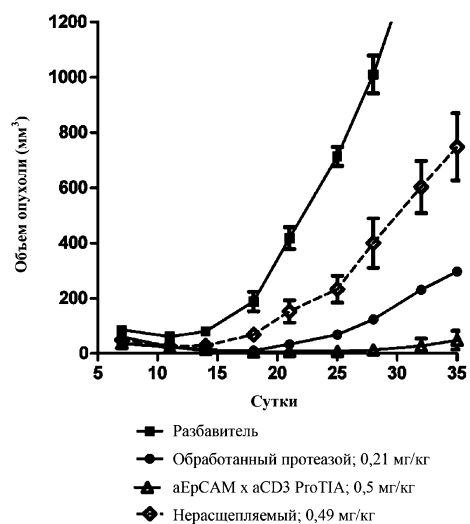
Фиг. 35В

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSTKSLHNSGITYLYWYQQKPKGAPKL
 LIYQMSNLSAGVPSRFSSSSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRT
 FGQGTKEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQLVQSGPGL
 VQPGGSGVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLEWMGWINTYTGESTYAD
 SFKGRFTFSLDTSASAAYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLT
 VSSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGA
 PKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQGNTL
 PWTFGQGTKEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLVESG
 GGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVST
 YNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDYFD
 VWGQGTLLTVSSGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSPTSTEE
 GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
 TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS
 PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS
 TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
 GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
 ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT
 SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
 SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE
 GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE
 PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEP
 SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS
 ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP
 GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGHHHHHH

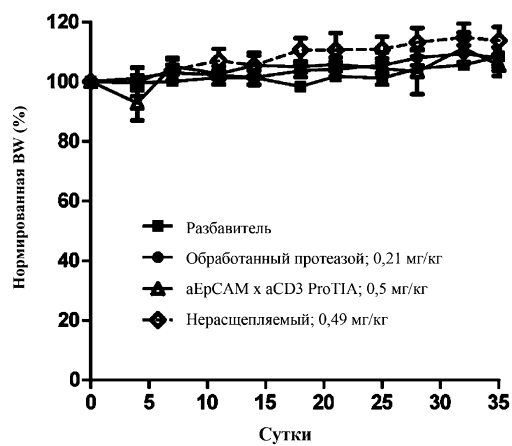
Фиг. 36

DIVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSKNLLHNSGITYLYWYQKPGQSPQL
 LIYQMSNLSAGVPSRFSSSSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCAQNLEIPRT
 FGQGTKEIKGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGQVQLVQSGPEV
 KKPASVSVCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTGESTYAD
 DFKGRFAFSLDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFCARFGNYVDYWGQGSLLT
 VSSGGGSELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPKG
 QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGAALTLGSGVQPEDEAEYCALWY
 SNLWVFGGGLTKLTVLGATPPETGAETESPGETTGGSAESEPPGEGEVQLLE
 SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNN
 YATYYADSVKDRFTISRDDSNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSY
 VSWFAYWGQGTLLTVSSGTAEAAASAGLSGRSDNHSPLGLAGSPGSPAGSP
 TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
 APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
 SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA
 GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS
 EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
 APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST
 EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP
 TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES
 GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG
 SPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST
 EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG
 GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES
 GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGT
 TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE
 ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS
 EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGHHHHHH

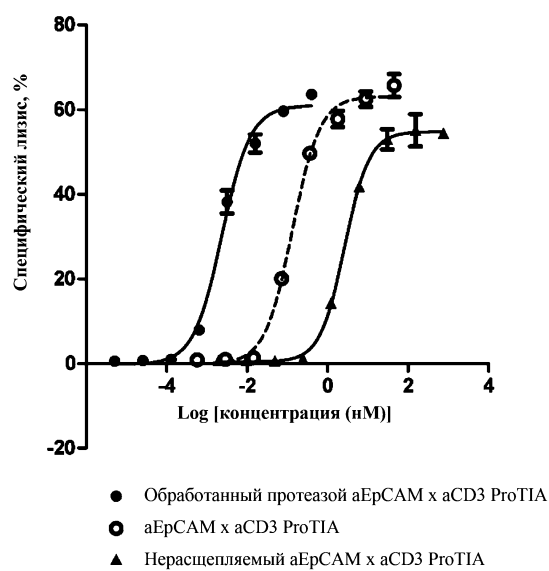
Фиг. 37



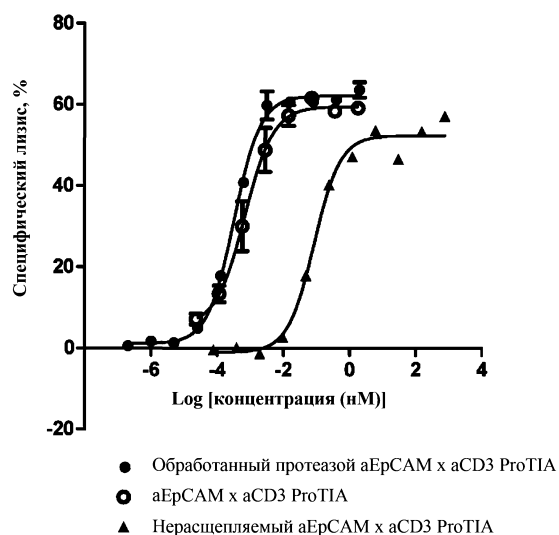
Фиг. 38



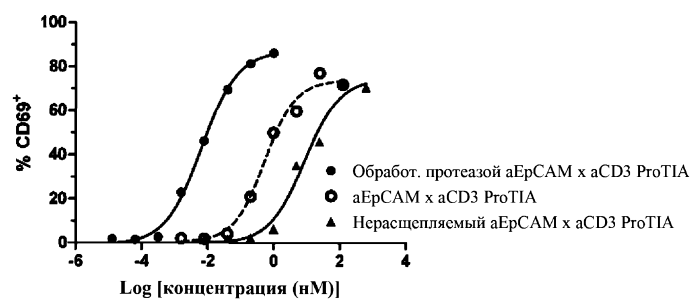
Фиг. 39



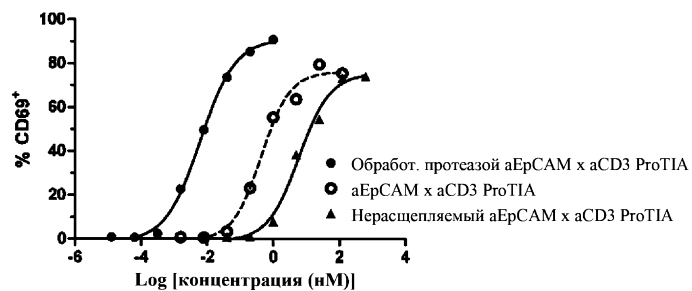
Фиг. 40



Фиг. 41

Активация CD69 на CD8⁺

Фиг. 42А

Активация CD69 на CD4⁺

Фиг. 42В

Активация CD69/CD25 на CD8⁺

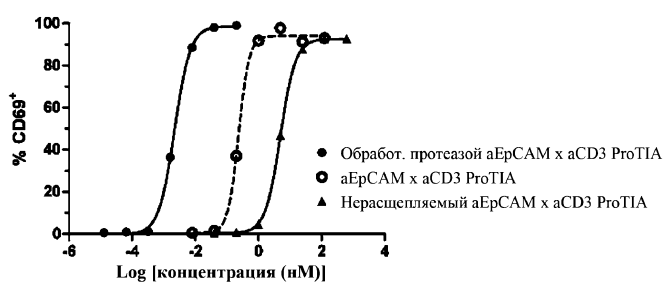
Фиг. 43А

Активация CD69/CD25 на CD4⁺

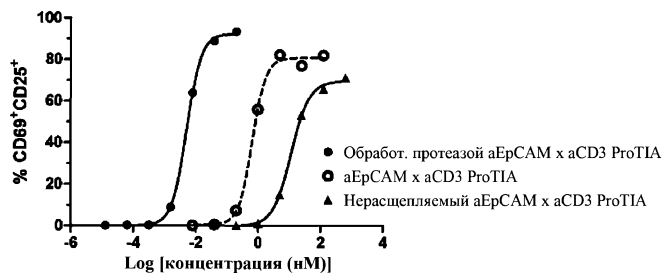
Фиг. 43В

Активация CD69 на CD8⁺

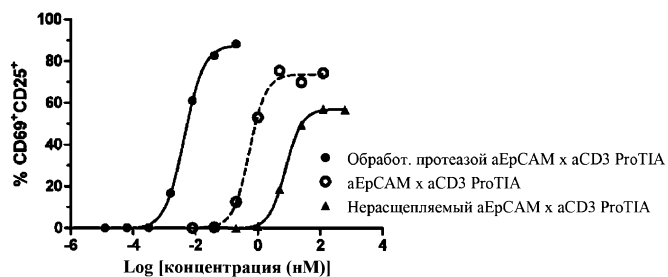
Фиг. 44А

Активация CD69 на CD4⁺

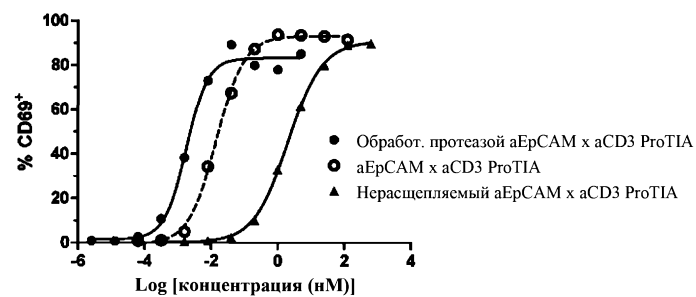
Фиг. 44В

Активация CD69/CD25 на CD8⁺

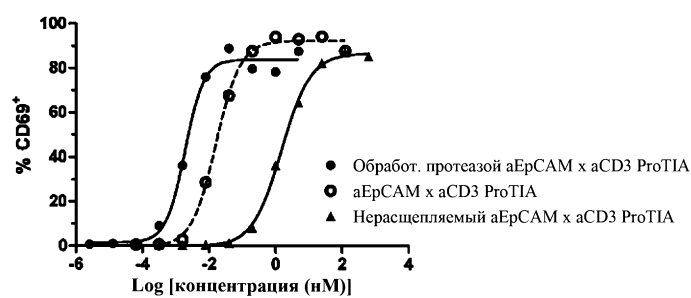
Фиг. 45А

Активация CD69/CD25 на CD4⁺

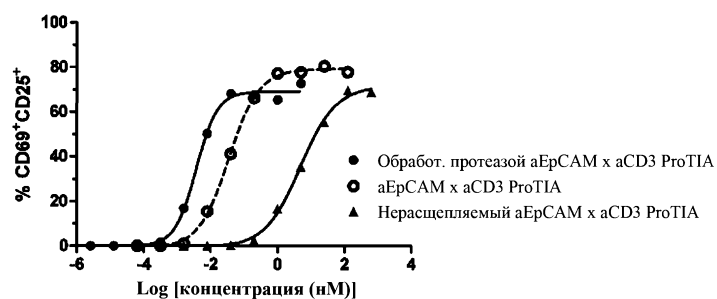
Фиг. 45В

Активация CD69 на CD8⁺

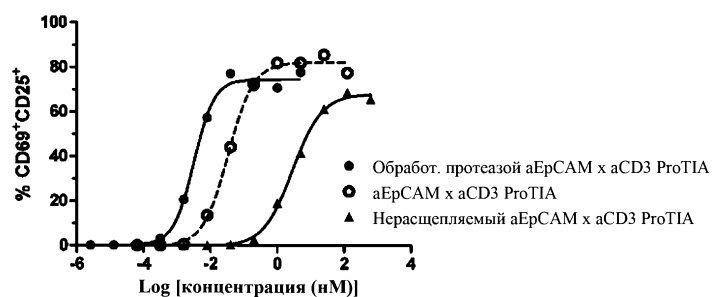
Фиг. 46А

Активация CD69 на CD4⁺

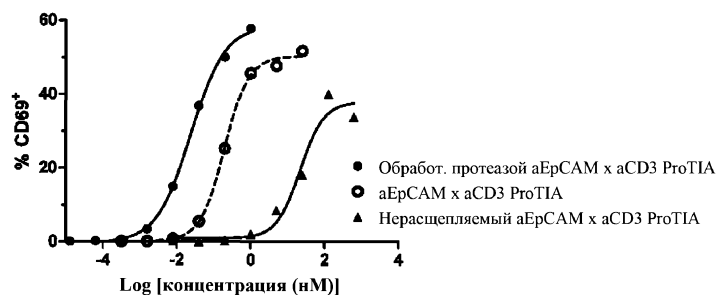
Фиг. 46В

Активация CD69/CD25 на CD8⁺

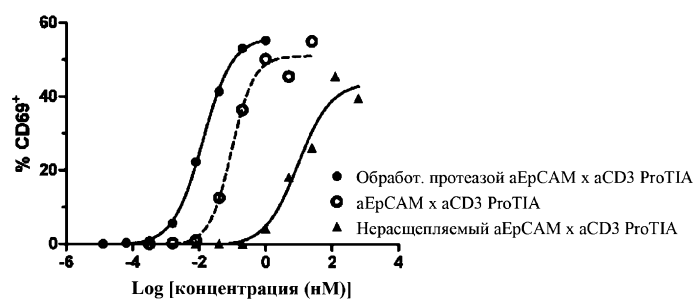
Фиг. 47А

Активация CD69/CD25 на CD4⁺

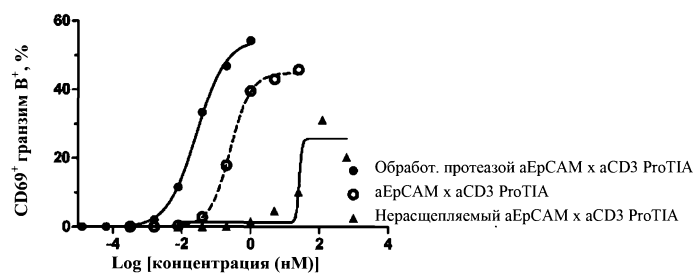
Фиг. 47В

Активация CD69 на CD8⁺

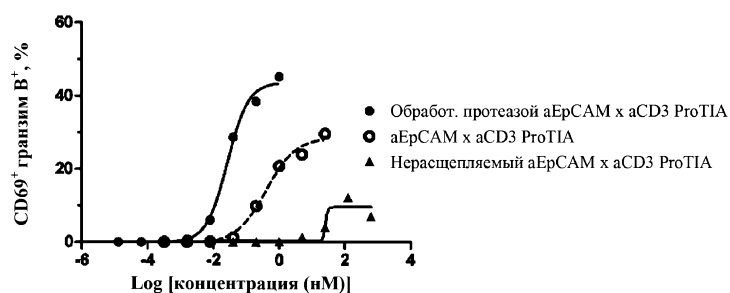
Фиг. 48А

Активация CD69 на CD4⁺

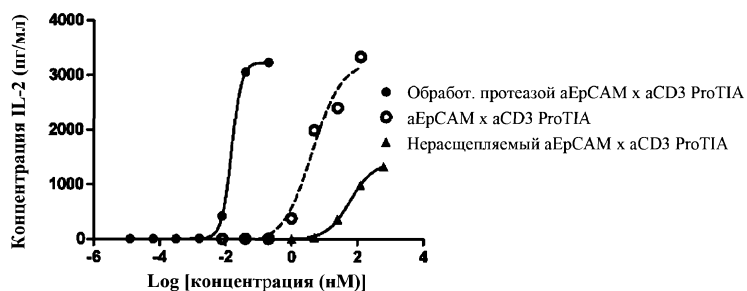
Фиг. 48В

Активация CD69/гранзима В в CD8⁺

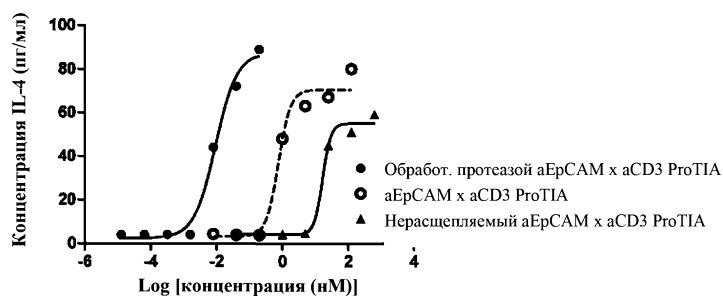
Фиг. 49А

Активация CD69/гранзима В в CD4⁺

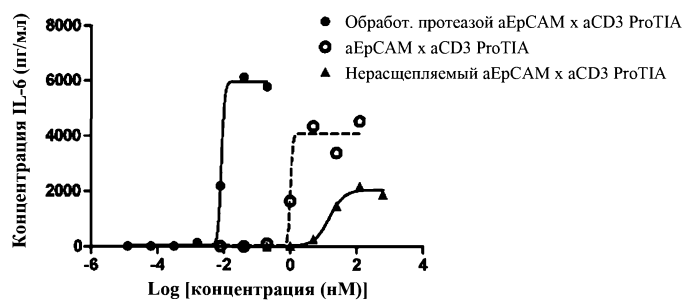
Фиг. 49В



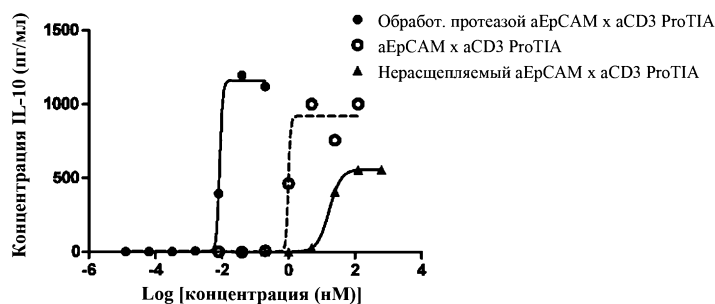
Фиг. 50А



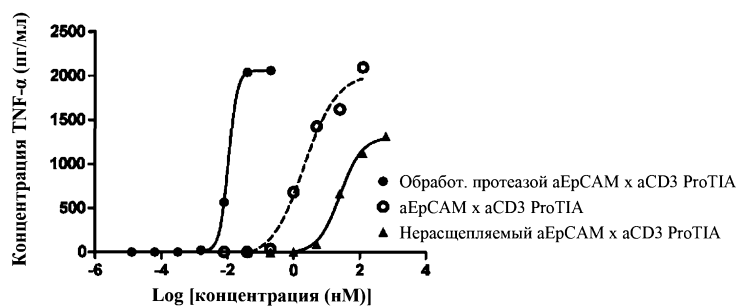
Фиг. 50В



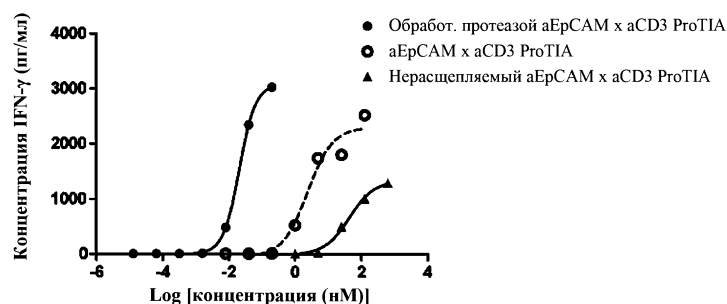
Фиг. 51А



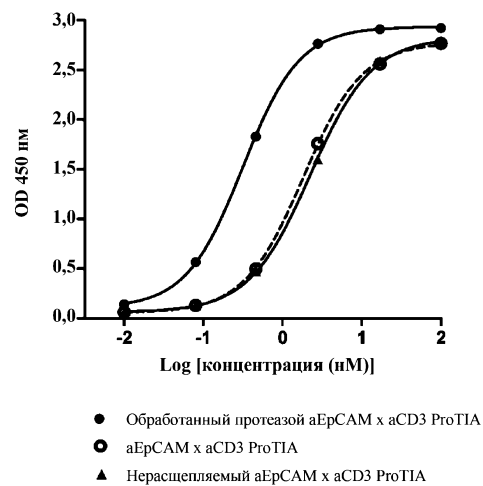
Фиг. 51В



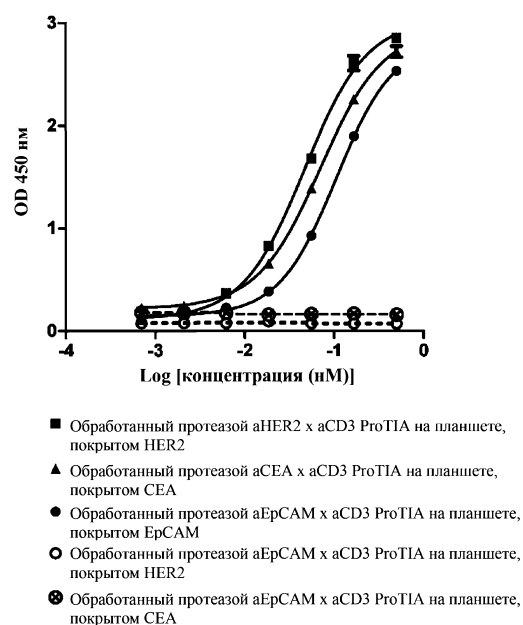
Фиг. 52А



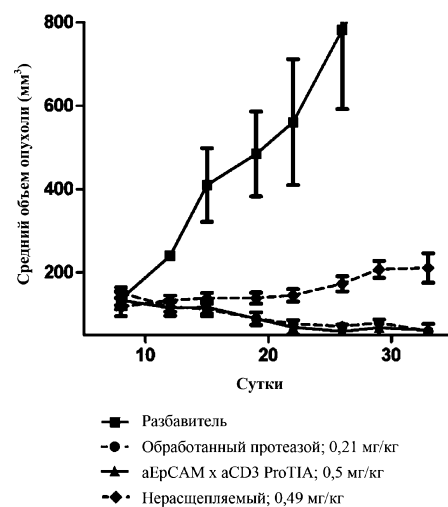
Фиг. 52В



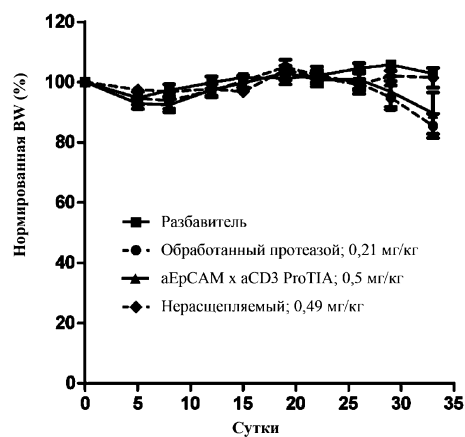
Фиг. 53



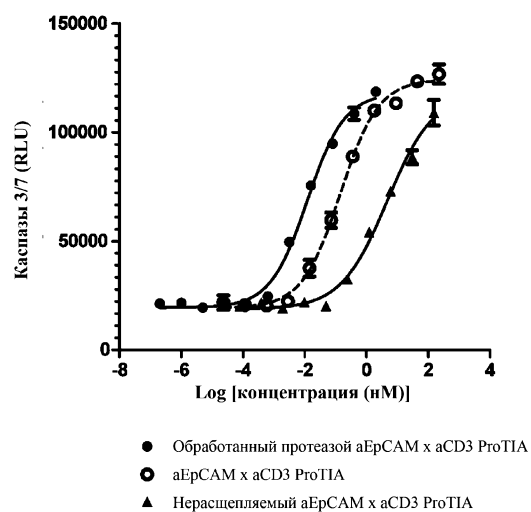
Фиг. 54



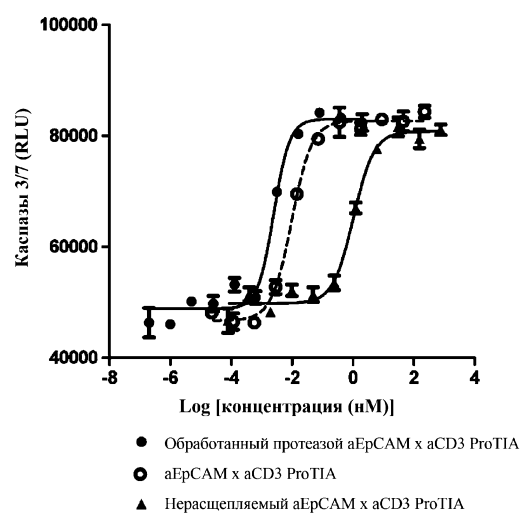
Фиг. 55



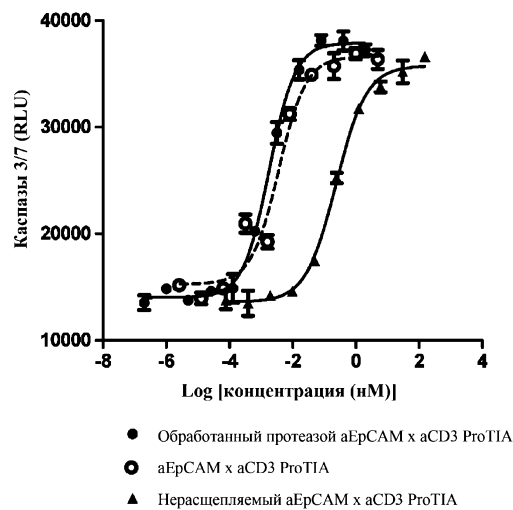
Фиг. 56



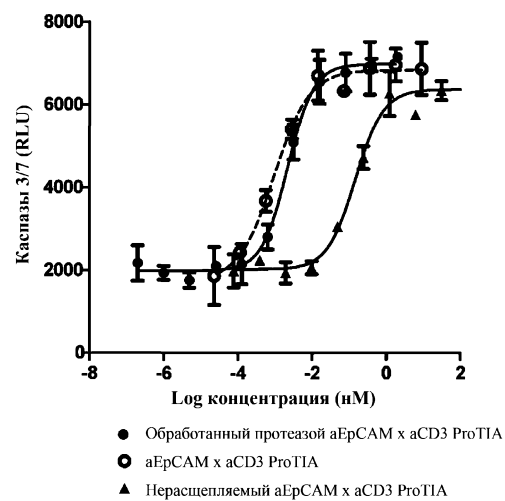
Фиг. 57



Фиг. 58



Фиг. 59



Фиг. 60

