



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124254** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 02046	(72) Винахідник(и):	Аст Олівер (CH), Бакак Маріна (CH), Імхоф-Юнг Забіне (DE), Йегер Крістіане (CH), Кляйн Крістіан (CH), Клостерманн Штефан (DE), Молхой Міхаель (DE), Регула Йорг Томас (DE), Шефер Вольфганг (DE), Умана Пабло (CH)
(22) Дата подання заявки:	03.08.2015	(73) Володілець (володільці):	Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	19.08.2021	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	14179764.7, 15170866.6	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015150447 A1, 08.10.2015 EP 2647707 A1, 09.10.2013 WO 2014081955 A1, 30.05.2014 WO 2009089004 A1, 16.07.2009 WO 2014056783 A1, 17.04.2014 WO 2014039855 A1, 13.03.2014
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	04.08.2014, 05.06.2015		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP, EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.07.2017, Бюл.№ 13		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	18.08.2021, Бюл.№ 33		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2015/067776, 03.08.2015		

(54) БІСПЕЦИФІЧНА АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНА МОЛЕКУЛА, ЯКА АКТИВУЄ Т-КЛІТИНИ**(57) Реферат:**

Винахід стосується біспецифічної антигензв'язувальної молекули для активації Т-клітин і її переорієнтації до конкретних клітин-мішеней. Також винахід стосується полінуклеотиду, який кодує зазначену біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, вектора і клітини-хазяїна, які містять зазначений полінуклеотид. Також винахід стосується способу одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, і способу застосування зазначеної біспецифічної антигензв'язувальної молекули для лікування раку.

UA 124254 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься в цілому до біспецифічних антигензв'язувальних молекул, призначених для активації Т-клітин. Крім того, даний винахід відноситься до полінуклеотидів, які кодуєть зазначені біспецифічні антигензв'язувальні молекули, і до векторів і клітин-хазяїв, які містять зазначені полінуклеотиди. Винахід також відноситься до способів одержання біспецифічних антигензв'язувальних молекул, пропонує у винаході, і до способів застосування таких біспецифічних антигензв'язувальних молекул для лікування захворювання.

Передумови створення винаходу

В різних клінічних ситуаціях часто потрібна вибіркова деструкція індивідуальної клітини або конкретного типу клітин. Наприклад, основною задачею при терапії раку є руйнування саме пухлинних клітин зі збереженням при цьому в інтактному і непошкоджені стані здорових клітин і тканин.

Перспективним підходом для досягнення цієї мети є індукція імунної відповіді проти пухлини, при якій імунні ефекторні клітини, такі як природні клітини-кілери (NK) або цитотоксичні Т-лімфоцити (CTL), атакують і руйнують пухлинні клітини. CTL являють собою найбільш ефективні ефекторні клітини імунної системи, однак вони не можуть активуватися ефекторним механізмом, опосередковуваним Fc-доменом канонічних терапевтичних антитіл.

В цьому плані в останні роки зріс інтерес до біспецифічних антитіл, призначених для зв'язування за допомогою одного "плеча" з поверхневим антигеном на клітинах-мішенях, а за допомогою іншого "плеча" з активуючим інваріантним компонентом комплексу Т-клітинного рецептора (TCR). Одночасне зв'язування такого антитіла з обома його мішенями повинне приводити до тимчасової взаємодії між клітиною-мішенню і Т-клітиною, викликаючи активацію будь-якої цитотоксичної Т-клітини і наступний лізис клітини-мішені. Таким чином, імунна відповідь переорієнтується до клітин-мішеней і не залежить від презентації пептидного антигена клітиною-мішенню або від специфічності Т-клітини, що має місце при нормальній обмеженій ГКГС активації CTL. В цьому контексті вирішальне значення має те, що CTL активуються тільки тоді, коли клітина-мішень презентує їм біспецифічне антитіло, тобто має місце імітація імунологічного синапсу. Найбільш кращими є біспецифічні антитіла, для яких не потрібне попереднє кондиціонування або співстимуляція лімфоцитів для того, щоби викликати ефективний лізис клітин-мішеней.

Розроблено декілька форматів біспецифічних антитіл і вивчена можливість їх застосування для опосередкованої Т-клітинами імунотерапії. Серед них дуже добре охарактеризовані так називані молекули BiTE (біспецифічний активатор Т-клітини), і вже встановлена їх певна перспективність в клінічних дослідженнях (див. огляд Nagorsen і Bäuerle, *Exp Cell Res* 317, 12011, сс. 255-1260). BiTE являють собою тандемні молекули scFv, в яких дві молекули scFv злиті за допомогою гнучкого лінкера. Крім того, для активації (залучення до процесу) Т-клітин досліджували біспецифічні формати, включаючи димерні антитіла (діабоді) (Holliger і ін., *Prot Eng* 9, 1996, сс. 299-305) і їх похідні, такі як тандемні димерні антитіла (Kipriyanov і ін., *J Mol Biol* 293, 1999, сс. 41-66). В останні роки розроблені так називані молекули DART (періорієнтуючі антитіла з подвійною афінністю), які засновані на форматі димерних антитіл, але відрізняються С-кінцевим дисульфідним містком, який призначений для додаткової стабілізації (Moore і ін., *Blood* 117, 2011, сс. 4542-4551). Так називані триомаби (трифункціональні антитіла), які являють собою повні гібридні мишачі/щурячі IgG-молекули і які також даний час проходять клінічні випробування, являють собою молекули більшого формату (див. огляд Seimetz і ін., *Cancer Treat Rev* 36, 2010, сс. 458-467).

Продемонстровано, що різні розроблювані формати мають великий потенціал для імунотерапії, пов'язаний з Т-клітинною переорієнтацією і активацією. Однак завдання створення придатних для цього біспецифічних антитіл ні в якому разі не є тривіальним, а потребує вирішення ряду проблем, пов'язаних з вимогами ефективності, токсичності, можливості застосування і технологічності антитіл.

Невеликі конструкції, такі, наприклад, як молекули BiTE, хоча вони мають здатність ефективно перехресно зв'язувати ефекторні клітини і клітини мішені, мають дуже короткий час напівжиття в сироватці, що потребує їх введення пацієнтам шляхом безперервної інфузії. З іншого боку, IgG-подібні формати, хоча вони мають значну перевагу з позицій тривалого часу напівжиття, мають такий недолік як токсичність, асоційована з нативними ефекторними функціями, які притаманні молекулам IgG. Їх імуногенний потенціал являє собою іншу характеристику IgG-подібних біспецифічних антитіл, насамперед нелюдського формату, несприятливу з позицій їх успішного терапевтичного застосування. І, нарешті, основною проблемою при звичайному підході до створення біспецифічних антитіл є одержання біспецифічних конструкцій антитіл в достатній для клінічних випробувань кількості, які при

цьому мають достатню чистоту, ця проблема пов'язана з помилковим спарюванням важких і легких ланцюгів антитіл з різними специфічностями при спільній експресії, що знижує вихід правильно складеної конструкції і приводить до одержання ряду нефункціональних побічних продуктів, від яких може виявитися важко відокремлювати необхідне біспецифічне антитіло.

Різні підходи застосовувалися для подолання проблеми, пов'язаної з асоціацією ланцюгів в біспецифічних антитілах (див., наприклад, Klein і ін., mAbs 6, 2012, сс. 653-663). Наприклад, стратегія "knobs-into-holes" (взаємодія за типом виступи-у-западини) сприяє посиленню спарювання двох різних важких ланцюгів антитіла шляхом інтродукції мутацій в СН3-домени для модифікації в поверхні поділу, в якій має місце контакт. Амінокислоти з об'ємними бічними ланцюгами одного ланцюга замінюють на амінокислоти з короткими бічними ланцюгами для створення "западини". І, навпаки, амінокислоти з великими бічними ланцюгами інтродукують в інший СН3-домен для створення "виступу". Шляхом спільної експресії двох важких ланцюгів (і двох ідентичних легких ланцюгів, що відповідають обом важким ланцюгам) отримують високі виходи гетеродимеру ("виступ-западина") відносно гомодимеру ("западина-западина" або "виступ-виступ" (Ridgway J.B. і ін., Protein Eng. 9, 1996, сс. 617-621 і WO 96/027011). Відсотковий вміст гетеродимеру можна додатково підвищувати шляхом ремоделювання поверхонь поділу двох СН3-доменів, використовуючи підхід, заснований на застосуванні фагового дисплею, і інтродукції дисульфідного містка для стабілізації гетеродимерів (Merchant A.M. і ін., Nature Biotech. 16, 1998, сс. 677-681; Atwell S. і ін., J. Mol. Biol. 270, 1997, сс. 26-35). Нові підходи до технології "knobs-into-holes" описані, наприклад, в EP 1870459 A1.

Однак стратегія "knobs-into-holes" не вирішує проблему помилкового спарювання важкого ланцюга - легкого ланцюга, що має місце в біспецифічних антитілах, які містять різні легкі ланцюги для спарювання з різними антигенами-мішенями.

Стратегія, застосовувана для попередження помилкового спарювання важкого ланцюга - легкого ланцюга, являє собою обмін доменами між важким і легким ланцюгами одного з плечей біспецифічного антитіла, що спарюються (див. WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254 і Schaefer W. і ін., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191, в яких описані біспецифічні антитіла IgG-типу з кросовером доменів).

Обмін варіабельних доменів VH і VL важкого і легкого ланцюгів в одному з плечей біспецифічного антитіла, що зв'язуються (WO 2009/080252, див. також Schaefer W. і ін., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191) виражено знижує рівень побічних продуктів, утворених в результаті помилкового спарювання легкого ланцюга, спрямованого проти першого антигена, з "неправильним" важким ланцюгом, спрямованим проти іншого антигена (у порівнянні з підходами без такого обміну доменів). Однак препарати зазначених антитіл не повністю вільні від побічних продуктів. Основним побічним продуктом є продукт, одержаний в результаті взаємодії бенс-джонсовського типу (Schaefer W. і ін., PNAS, 108, 2011, сс. 11187-11191; на фіг.S11 доповнення). Таким чином, бажаним є додаткове зниження рівня зазначених побічних продуктів для підвищення, наприклад, виходу зазначених біспецифічних антитіл.

З урахуванням труднощів і недоліків, властивих доступним в даний час біспецифічним антитілам, призначеним для опосередковуваної Т-клітинами імунотерапії, зберігається потреба в створенні нових покращених форматів зазначених молекул. В даному винаході запропоновані біспецифічні антигензв'язувальні молекули, створені для активації і переорієнтації Т-клітин, в яких об'єднані висока ефективність і технологічність з низькою токсичністю і бажаними фармакокінетичними властивостями.

Стислий виклад суті винаходу

Відповідно до винаходу співвідношення необхідного біспецифічного антитіла і небажаних побічних продуктів, насамперед побічних продуктів, одержаних в результаті взаємодії бенс-джонсовського типу, які зустрічаються в біспецифічних антитілах з обміном VH/VL-доменів в одному з їх зв'язувальних плечей, можна підвищувати шляхом інтродукції заряджених амінокислот з протилежними зарядами у визначені амінокислотні положення в СН1- і CL-доменах.

Таким чином, першим об'єктом даного винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, та містить

(а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;

(б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном, і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab замінені один на одного;

де перший антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини, а другий антиген являє собою антиген клітини-мішені, або перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини; і

в якій

I) в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); або

II) в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

Відповідно до винаходу друга молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab, в якій варіабельні області легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені. В конкретних варіантах здійснення винаходу перша (і третя, якщо вона присутня) молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу не більше однієї молекули Fab, що має здатність специфічно зв'язуватися з активуючим Т-клітини антигеном, присутньо в біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, яка активує Т-клітини (тобто для біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, характерно одновалентне зв'язування з антигеном, що активує Т-клітини).

В конкретному варіанті здійснення винаходу перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу антиген, який активує Т-клітини, являє собою CD3, насамперед CD3 епсилон. В одному з варіантів здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою CD20.

В одному з варіантів біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В наступному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В ще одному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і амінокислота в положенні 123 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В кращому варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на аргінін (R)

(нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена на глютамінову кислоту (Е) (нумерація відповідно до ЕВ-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глютамінову кислоту (Е) (нумерація відповідно до ЕВ-індексу Кебота).

5 В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, містить

(а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;

(б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном, і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab замінені один на одного;

10 де перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини; і

в якій в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і амінокислота в положенні 123 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В альтернативному варіанті біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В іншому варіанті здійснення винаходу в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В наступному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і амінокислота в положенні 123 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В іншому варіанті здійснення винаходу в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, додатково містить третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном.

В конкретних варіантах здійснення винаходу третя молекула Fab ідентична першій молекулі Fab. Таким чином, в цих варіантах здійснення винаходу третя молекула Fab містить такі ж амінокислотні заміни, що і перша молекула Fab. Подібно першій молекулі Fab третя молекула Fab, зокрема, може являти собою канонічну молекулу Fab.

Якщо третя молекула Fab присутня, то в конкретному варіанті здійснення винаходу перша і третя молекули Fab специфічно зв'язуються з антигеном клітини-мішені, а друга молекула Fab специфічно зв'язується антигеном, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон.

В деяких варіантах біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), і друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), злиті одна з одною, необов'язково через пептидний лінкер. В конкретному варіанті здійснення винаходу друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В альтернативному варіанті здійснення винаходу перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. У варіантах здійснення винаходу, в яких або (I) друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, або (II) перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, додатково легкий ланцюг Fab першої молекули Fab і легкий ланцюг Fab другої молекули Fab можуть бути злиті один з одним, необов'язково через пептидний лінкер.

В конкретних варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, додатково містить Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації.

Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, може мати різні конфігурації, тобто перша, друга (і необов'язково третя) молекули Fab можуть бути злиті одна з одною і з Fc-доменом різними шляхами. Компоненти можуть бути злиті один з одним безпосередньо або переважно через один або декілька прийнятних пептидних лінкерів. Якщо злиття має місце з N-кінцем субодиниці Fc-домену, то воно, як правило, відбувається через шарнірну область імуноглобуліну.

В одному з варіантів здійснення винаходу друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В зазначеному варіанті здійснення винаходу перша молекула Fab може бути злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab або з N-кінцем іншої однієї з субодиниць Fc-домену.

В одному з варіантів здійснення винаходу перша і друга молекули Fab кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену. В зазначеному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить в основному молекулу імуноглобуліну, в якій в одному з Fab-плечей варіабельні області важкого і легкого ланцюга VH і VL обмінені/замінені один на одного (див. фіг. 1А, Г).

В альтернативних варіантах здійснення винаходу третя молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. Зокрема, в зазначеному варіанті здійснення винаходу друга і третя молекули Fab кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, а перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. В цьому варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить в основному молекулу імуноглобуліну, в якій в одному з Fab-плечей варіабельні області важкого і легкого ланцюга VH і VL обмінені/замінені одна на одну і в якій додаткова (канонічна) молекула Fab злита на N-кінці з зазначеним плечем Fab (див. фіг. 1 Б, Г'). В іншому зазначеному варіанті здійснення винаходу перша і третя молекули Fab кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, а друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В цьому варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить в основному молекулу імуноглобуліну з додатковою молекулою Fab, злиною на N-кінці з одним з плечей Fab імуноглобуліну, при цьому в зазначеній додатковій молекулі Fab варіабельні області важкого і легкого ланцюга VH і VL обмінені/замінені один на одного (див. фіг. 1 В, Д).

У всіх різних конфігураціях біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-

клітини, пропонованої у винаході, амінокислотні заміни, зазначені в даному описі, можуть мати місце або в CH1- і CL-доменах першої і (якщо вона присутня) третьої молекули Fab, або в CH1- і CL-доменах другої молекули Fab. Переважно вони мають місце в CH1- і CL-доменах першої і (якщо вона присутня) третьої молекули Fab. Відповідно до концепції винаходу, якщо

амінокислотні заміни, зазначені в даному описі, здійснюються в першій (і, якщо вона присутня, в третій) молекулі Fab, то жодних амінокислотних заміни не здійснюються в другій молекулі Fab. І, навпаки, якщо амінокислотні заміни, зазначені в даному описі, здійснюються в другій молекулі Fab, то жодних амінокислотних заміни не здійснюються в першій (і, якщо вона присутня, в третій) молекулі Fab.

В конкретних варіантах біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, насамперед, коли амінокислотні заміни, зазначені в даному описі, здійснюються в першій (і, якщо вона присутня, в третій) молекулі Fab, то константний домен CL першої (і, якщо вона присутня, третьої) молекули Fab відноситься до каппа-ізо типу. В конкретних варіантах біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, насамперед, коли амінокислотні заміни, зазначені в даному описі, здійснюються в другій молекулі Fab, то константний домен CL другої молекули Fab відноситься до каппа-ізо типу. В деяких варіантах здійснення винаходу константний домен CL першої (і, якщо вона присутня, третьої) молекули Fab і константний домен CL другої молекули Fab відносяться до каппа-ізо типу.

В конкретному варіанті здійснення винаходу молекула імуноглобуліну, яка міститься в біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, являє собою імуноглобулін IgG-класу. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін IgG₁-підкласу. В іншому варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін IgG₄-підкласу.

Конкретним варіантом здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить

- а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;
- б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені один на одного;
- в) третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном; і
- г) Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до стабільної асоціації;

де перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон;

в якій третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), ідентична першій молекулі Fab, зазначеній у підпункті а);

в якій в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) або на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в якій в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і в якій

(I) перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), а друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, зазначеного в підпункті г), або

(II) друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), а перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, зазначеного в підпункті г).

Ще більш конкретним варіантом здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить

- а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;
- б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені один на одного;
- в) третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном; і
- г) Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до

стабільної асоціації;

де перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон;

в якій третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), ідентична першій молекулі Fab, зазначеній у підпункті а);

в якій в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в якій в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і в якій перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), а друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, зазначеного в підпункті г).

Іншим варіантом здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить

а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;

б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені один на одного;

в) Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до стабільної асоціації;

в якій

(I) перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон; або

(II) другий антиген являє собою антиген клітини-мішені, а перший антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон;

в якій в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) або на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в якій в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і в якій перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), і друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, зазначеного в підпункті в).

В конкретних варіантах біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, Fc-домен являє собою Fc-домен IgG. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₄. Ще в одному конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₄, що містить амінокислотну заміну S228P (нумерація за Кеботом). В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою людський Fc-домен.

В конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен містить модифікацію, яка сприяє асоціації першої і другої субодиниць Fc-домену. В зазначеному конкретному варіанті здійснення винаходу амінокислотний залишок в CH3-домени першої субодиниці Fc-домену замінюють на амінокислотний залишок, що має більший об'єм бічного ланцюга, створюючи тим самим опуклість в CH3-домени першої субодиниці, яка може поміщатися в порожнину в CH3-домени другої субодиниці, а амінокислотний залишок в CH3-домени другої субодиниці Fc-домену замінюють на амінокислотний залишок, що має менший об'єм бічного ланцюга, утворюючи тим самим порожнину в CH3-домени другої субодиниці, в яку може поміщатися опуклість в CH3-домени першої субодиниці.

В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен має знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або знижену ефекторну функцію у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG₁. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен створюють так, щоби він мав знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або знижену ефекторну функцію у порівнянні з не створеним за допомогою інженерії Fc-доменом. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить одну або декілька амінокислотну(их) заміну(н), яка(і) знижує(ють) зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію. В одному з варіантів здійснення винаходу одна або декілька

амінокислотна(их) заміна(н) в Fc-домені, яка(і) знижує(ють) зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, знаходиться(яться) в одному або декількох положеннях, вибраних з групи, що включає L234, L235 і P329 (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В конкретних варіантах здійснення винаходу кожна субодиниця Fc-домену містить три амінокислотні заміни, які знижують зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, де зазначені амінокислотні заміни являють собою L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁, насамперед Fc-домен людського IgG₁. В інших варіантах здійснення винаходу кожна субодиниця Fc-домену містить дві амінокислотні заміни, які знижують зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, де зазначені амінокислотні заміни являють собою L235E і P329G (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₄, насамперед Fc-домен людського IgG₄. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, являє собою Fc-домен IgG₄ і містить амінокислотні заміни L235E і S228P (SPLE) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активуючий Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський FcγRIIa, FcγRI і/або FcγRIIIa. В одному з варіантів здійснення винаходу ефекторна функція являє собою антитіло-обумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC).

В конкретному варіанті біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон, містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 9, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 10. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, насамперед CD3, більш переважно CD3 епсилон, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7. В одному з конкретних варіантів здійснення винаходу друга молекула Fab, що входить до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, специфічно зв'язується з CD3, більш переважно CD3 епсилон і містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 9, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 10. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена друга молекула Fab містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

В іншому конкретному варіанті біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені, насамперед CD20, містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 46, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 47, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 50, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 51. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені, насамперед CD20, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 30, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 31. В одному з конкретних варіантів здійснення винаходу перша (і, якщо присутня, третя) молекула Fab, що входить до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, специфічно зв'язується з CD20, і містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 46, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 47, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 49, CDR

2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 50, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 51. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена перша (і, якщо присутня, третя) молекула Fab містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31.

Конкретним об'єктом винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить

а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;

б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені один на одного;

в) третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном; і

г) Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до стабільної асоціації;

де

(I) перший антиген являє собою CD20, а другий антиген являє собою CD3, насамперед CD3 епсилон;

(II) перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 46, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 47, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 50, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 51, а друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), містить CDR 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 9, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 10;

(III) в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) або на аргінін (R), переважно на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в якій в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і

(IV) перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), а друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, зазначеного в підпункті г).

Іншим об'єктом винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить

а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;

б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab обмінені один на одного;

в) третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном; і

г) Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до стабільної асоціації;

де

(I) перший антиген являє собою CD20, а другий антиген являє собою CD3, насамперед CD3 епсилон;

(II) перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 46, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 47, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 50, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 51, а друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), містить CDR 1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 67, CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 68, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 9, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 10;

(III) в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) або на

аргінін (R), переважно на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в якій в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і

(IV) перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), а друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, зазначеного в підпункті г).

Іншим об'єктом винаходу є один або декілька виділених(их) полінуклеотид(ів), що кодує(ють) біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході. Винахід також відноситься до одного або декількох експресійного(их) вектору(ів), що містить(ять) виділений(и) полінуклеотид, пропонований у винаході, і клітини-хазяїна, яка містить виділений(и) полінуклеотид(и) або експресійний(і) вектор(и), пропонований(и) у винаході. В деяких варіантах здійснення клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, зокрема, клітину ссавця.

Іншим об'єктом винаходу є спосіб одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, який полягає в тому, що здійснюють стадії, на яких а) культивують клітину-хазяїна, пропоновану у винаході, в умовах, придатних для експресії біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, і б) виділяють біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини. Винахід також відноситься до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, одержаної способом, пропонованим у винаході.

Винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, і фармацевтично прийнятний носій.

Під обсяг винаходу підпадають також способи застосування біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, і фармацевтичної композиції, пропонованих у винаході. Одним з об'єктів винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, або фармацевтична композиція, пропонована у винаході, призначена для застосування як лікарський засіб. Одним з об'єктів винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, або фармацевтична композиція, пропонована у винаході, призначена для застосування при лікуванні захворювання у індивідуума, який потребує цього. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак.

Запропоновано також застосування біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, для приготування лікарського засобу для лікування захворювання у індивідуума, який потребує цього; а також спосіб лікування захворювання у індивідуума, який полягає в тому, що вводять вказаному індивідууму в терапевтично ефективній кількості композицію, яка містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, в фармацевтично прийнятній формі. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. У будь-якому з перерахованих вище варіантів здійснення винаходу індивідуум переважно являє собою ссавця, насамперед людину.

У винаході також запропонований спосіб індукції лізису клітини-мішені, насамперед пухлинної клітини, який полягає в тому, що приводять у контакт клітину-мішень з біспецифічною антигензв'язувальною молекулою, яка активує Т-клітини, пропованою у винаході, за присутності Т-клітини, насамперед цитотоксичної Т-клітини.

Стислий опис креслень

На кресленнях показано:

на фіг. 1 - приклади конфігурацій біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини (TCB), пропонованих у винаході. (А, Г) Ілюстрація молекули "1+1 CrossMab". (Б, Ґ) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab" з альтернативним розташуванням Crossfab- і Fab-компонентів ("інвертована" молекула). (В, Д) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab". (Е, І) Ілюстрація молекули "1+1 IgG Crossfab" з альтернативним розташуванням Crossfab- і Fab-компонентів ("інвертована"). (Є, І) Ілюстрація молекули "1+1 IgG Crossfab". (Ж, Ї) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab" з двома CrossFab. (З, Й) Ілюстрація молекули "2+1 IgG Crossfab" з двома CrossFab і з альтернативним розташуванням Crossfab- і Fab-компонентів ("інвертована"). (К, О) Ілюстрація молекули "Fab-Crossfab". (Л, П) Ілюстрація молекули "Crossfab-Fab". (М, Р) Ілюстрація молекули "(Fab)₂-Crossfab". (Н, С) Ілюстрація молекули "Crossfab-(Fab)₂". (Т, Ф) Ілюстрація молекули "Fab-(Crossfab)₂". (У, Х) Ілюстрація молекули

"(Crossfab)₂-Fab". Чорна точка: необов'язкова модифікація в Fc-домені, яка сприяє гетеродимеризації; ++, --: амінокислоти з протилежними зарядами, інтродуковані в CH- і CL-домени;

на фіг. 2 - ілюстрація TCB, одержаних в прикладі 1. (А) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (CH1/CL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті), (Б) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, з модифікаціями зарядів в CD20-зв'язувальних компонентах, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K), (В) "2+1 IgG CrossFab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD3-зв'язувальному компоненті, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K), (Г) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті), (Г) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (VH-CH1/VL-CL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті), (Д) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD20-зв'язувальних компонентах, модифікація заряду в CD3-зв'язувальному компоненті, EE=147E, 213E; KK=123K, 124K), (Е) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів і мутацією DDKK в Fc-області (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальних компонентах, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K), (Є) "1+1 CrossMab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальному компоненті, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K), (Ж) "1+1 CrossMab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальному компоненті, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K, другий CD20-зв'язувальний компонент), (З) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів 213E, 123R (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальному компоненті, E=213E; R=123R), (И) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін і модифікація зарядів в CD3-зв'язувальному компоненті);

на фіг. 3 - (А-Ж, Й, К) - результати аналізу методом капілярного електрофорезу за присутності ДСН (КЕ-ДСН) TCB, одержаних в прикладі 1 (кінцеві очищені препарати). (А) Електрофореграма молекули "А", що представлена на фіг. 2А, (Б) електрофореграма молекули "Б", що представлена на фіг. 2Б, (В) електрофореграма молекули "В", що представлена на фіг. 2В, (Г) електрофореграма молекули "Г", що представлена на фіг. 2Г, (Г) електрофореграма молекули "Г", що представлена на фіг. 2Г, (Д) електрофореграма молекули "А", що представлена на фіг. 2Д, (Е) електрофореграма молекули "Е", що представлена на фіг. 2Е, (Є) електрофореграма молекули "Є", що представлена на фіг. 2Є, (Ж) електрофореграма молекули "Ж", що представлена на фіг. 2Ж, (И) електрофореграма молекули "З", що представлена на фіг. 2З, (К) електрофореграма молекули "И", що представлена на фіг. 2И. Доріжка А = невідновні умови, доріжка Б = відновні умови. (З-И, Л, И) - результати аналізу методом ДСН-ПААГ TCB, одержаних в прикладі 1, після першої стадії очистки (афінна хроматографія на білку А). (З) ДСН-ПААГ, 4-12 % Біс-Трис, невідновні умови; доріжка 1 = маркер (Mark 12, незабарвлений стандарт, фірма Invitrogen); доріжки 2-11 = фракції, одержані після афінної хроматографії на білку А, молекули "Б", (И) ДСН-ПААГ, 3-8 % Трис-ацетат, невідновні умови; доріжка 1 = маркер (HiMark, фірма Invitrogen); доріжки 2-12 = фракції, одержані після афінної хроматографії на білку А, молекули "В", (И) ДСН-ПААГ, 4-12 % Біс-Трис, невідновні умови; доріжка 1 = маркер (Mark 12, незабарвлений стандарт, фірма Invitrogen); доріжки 2-14 = фракції, одержані після афінної хроматографії на білку А, молекули "Г", (Л) ДСН-ПААГ, 4-12 % Біс/Трис, невідновні умови; доріжка 1 = маркер (Mark 12, незабарвлений стандарт, фірма Invitrogen); доріжки 2-10 = фракції, одержані після афінної хроматографії на білку А, молекули "З", (М) ДСН-ПААГ, 4-12 % Біс/Трис, невідновні умови; доріжка 1 = маркер (Mark 12, фірма Invitrogen); доріжки 2-12 = фракції, одержані після афінної хроматографії на білку А, молекули "И". (И) - результати аналізу методом гель-фільтрації (SEC; перша стадія очистки) TCB, одержаних в прикладі 1 (молекула "А" (перша стадія SEC), "Б" і "Г", як зазначено вище);

на фіг. 4 - результати аналізу зв'язування з CD3 і CD20 біспецифічних антитіл (TCB), які активують Т-клітини, до CD3/до CD20 ("CD20 TCB") з модифікаціями зарядів або без них ("заряджені залишки") (див. приклад 1);

на фіг. 5 - результати аналізу лізису пухлинних клітин, індукованого біспецифічними антитілами (TCB), які активують Т-клітини, до CD3/до CD20 ("CD20 TCB") з модифікаціями зарядів або без них ("заряджені залишки") після інкубації протягом 24 год. з людськими РВМС (див. приклад 1);

на фіг. 6 - результати аналізу активації CD8⁺-Т-клітин (А) або CD4⁺-Т-клітин (Б) після опосередкованого Т-клітинами цитолізу експресуючих CD20 пухлинних клітин-мішеней (Nalm-6), індукованого біспецифічними антитілами (TCB), які активують Т-клітини, до CD3/до CD20

("CD20 TCB") з модифікаціями зарядів або без них ("заряджені залишки") (див. приклад 1);

на фіг. 7 - результати аналізу активації CD8⁺-Т-клітин (А) або CD4⁺-Т-клітин (Б) після опосередкованого Т-клітинами цитолізу експресуючих CD20 пухлинних клітин-мішеней (Z-138), індукованого біспецифічними антитілами (TCB), які активують Т-клітини, до CD3/до CD20 ("CD20 TCB") з модифікаціями зарядів або без них ("заряджені залишки") (див. приклад 1);

на фіг. 8 - результати аналізу В-клітинного виснаження в цільній крові здорової людини після інкубації з біспецифічними антитілами (TCB), які активують Т-клітини, до CD3/до CD20 ("CD20 TCB") з модифікаціями зарядів або без них ("заряджені залишки"); 22-годинний аналіз (див. приклад 1);

на фіг. 9 - результати аналізу активації CD8⁺-Т клітин (А) або CD4⁺-Т-клітин (Б) після опосередкованого Т-клітинами цитолізу експресуючих CD20 В-клітин в цільній крові здорової людини, індукованого біспецифічними антитілами (TCB), які активують Т-клітини, до CD3/до CD20 ("CD20 TCB") з модифікаціями зарядів або без них ("заряджені залишки") (див. приклад 1);

на фіг. 10 - результати аналізу зв'язування анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) з клітинами-мішенями, які експресують людський CD20 (А) і CD3 (Б);

на фіг. 11 - результати аналізу зв'язування анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) з клітинами-мішенями, які експресують CD20 і CD3 людини і мавп циномоглус. (А) В-клітини, (Б) CD4-Т-клітини, (В) CD8-Т-клітини;

на фіг. 12 - результати аналізу лізису пухлинних клітин, опосередкованого різними форматами антитіл у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB;

на фіг. 13 - результати аналізу лізису пухлинних клітин і наступної Т-клітинної активації, опосередкованих різними форматами антитіл у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB. (А-В) Лізис пухлинних клітин-мішеней лінії Z138 при використанні як ефекторні клітини PBMC від трьох різних донорів. (Г) Лізис панелі зазначених пухлинних клітин лінії DLBCL (дифузна великоклітинна В-клітинна лімфома);

на фіг. 14 - результати аналізу В-клітинного виснаження в людській цільній крові, опосередкованого різними форматами антитіл у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB;

на фіг. 15 - результати кількісного аналізу активації Т-клітин різними форматами антитіл у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB, на основі інтенсивності передачі сигналів CD3 в прямому напрямку з використанням репортерного аналізу Jurkat-NFAT;

на фіг. 16 - фармакокінетичні параметри, встановлені після і.в. болюсного введення в дозі 0,5 мг/кг антитіла у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б), на основі малої вибірки даних на NOG-мишах;

на фіг. 17 - схематичне зображення плану експерименту з оцінювання здатності викликати В-клітинне виснаження антитіла у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) у повністю гуманізованих NOG-мишей;

на фіг. 18 - результати кінетичного аналізу частоти зустрічальності В-клітин і Т-клітин в крові повністю гуманізованих NOG-мишей, оброблених (Б) антитілом у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) або (А) застосовуваним як контроль наповнювачем. D0, D7: дні ін'єкції терапевтичного засобу;

на фіг. 19 - результати аналізу експресії різних маркерів на поверхні периферичних Т-клітин через три дні (D3) і десять днів (D10) після ін'єкції наповнювача (чорні прямокутники) або антитіла у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) (білі прямокутники) повністю гуманізованим мишам;

на фіг. 20 - результати аналізу частоти зустрічальності В-клітин (А), частоти зустрічальності Т-клітин (Б) і експресії маркерів на поверхні Т-клітин (В) в селезінці у оброблених наповнювачем (чорні прямокутники) або антитілом у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) (білі прямокутники) повністю гуманізованих мишей в момент закінчення експерименту (D10 після першої ін'єкції терапевтичного засобу);

на фіг. 21- результати аналізу протипухлинної активності антитіла у вигляді анти-CD20/анти-CD3 TCB (молекула "Б" на фіг. 2Б) (0,5 мг/кг, один раз на тиждень) на моделі, створеній з використанням клітин лінії WSU-DLCL2 на NOG-мишах, з перенесенням huPBMC;

на фіг. 22- ілюстрація молекул "2+1 IgG CrossFab, інвертована", одержаних в прикладі 2. (1) Молекула без модифікацій зарядів, (2) молекула з модифікаціями зарядів в CH1- і CL-доменах молекул Fab, які специфічно зв'язуються з BCMA (В-клітинний антиген дозрівання) (EE=147E, 213E; KK=123K, 124K);

на фіг. 23 - результати аналізу методом KE-ДЧН (доріжка А = невідновні умови, доріжка Б = відновні умови, вгорі узагальнені параметри для доріжки А) молекул "2+1 IgG CrossFab, інвертована", застосовуваних в прикладі 2. Застосовували різні методи очистки (афінна хроматографія на білку А (РА), гель-фільтрація (SEC), катіонообмінна хроматографія (cIEX), і

кінцева стадія гель-фільтрації (re-SEC)) для молекули без модифікацій зарядів (83A10-TCB) і молекули з модифікаціями зарядів (83A10-TCBcv);

на фіг. 24 - результати аналізу методом KE-ДСН (доріжка А = невідновні умови, доріжка Б = відновні умови, вгорі узагальнені параметри для доріжки А) молекул "2+1 IgG CrossFab, інвертована", застосовуваних в прикладі 2, при їх порівнянні за принципом "голова до голови" (H2H) після стадій очистки афінною хроматографією на білку А (РА) і гель-фільтрації (SEC);

на фіг. 25- результати аналізу методом протокової цитометрії зв'язування біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, до ВСМА/до CD3 з ВСМА-позитивними клітинними лініями множинної мієломи. (А) 83A10-TCB на H929-клітинах і MKN45-клітинах, (Б) 83A10-TCBcv на H929-клітинах і MKN45-клітинах, (В) порівняння 83A10-TCB і 83A10-TCBcv на H929-клітинах;

на фіг. 26 -результати аналізу цитолізу ВСМА-позитивних клітин мієломи лінії H929 за допомогою антитіл у вигляді анти-ВСМА/анти-CD3 TCB ((А) 83A10-TCB, (Б) 83A10-TCBcv) за даними, отриманими на основі вивільнення ЛДГ;

на фіг. 27 - ілюстрація TCB, одержаних в прикладі 3. (А) "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в Her2-зв'язувальному компоненті, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K), (Б) "2+1 IgG CrossFab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в Her3-зв'язувальному компоненті, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K);

на фіг. 28 - результати аналізу методом KE-ДСН TCB, одержаних в прикладі 3 (препарат після остаточної очистки). (А) електрофореграма Her2 TCB, що представлена на 27А, (Б) електрофореграма Her3 TCB, що представлена на фіг. 27Б. Доріжка А = невідновні умови, доріжка Б = відновні умови;

на фіг. 29 - результати аналізу зв'язування Her2 TCB (А) і Her3 TCB (Б) з клітинами, отримані за допомогою FACS. Представлені медіанні інтенсивності флуоресценції, які характеризують зв'язування молекули Her2 TCB з людським CD3 на клітинах Jurkat (ліворуч) або з людським Her2 (А) або Her3 (Б) на клітинах KPL-4 (праворуч), виміряні за допомогою протокової цитометрії. Представлені медіанні величини флуоресценції за трьома повторностями, включаючи СКО;

на фіг. 30 - результати аналізу активації Т-клітин за допомогою Her3 TCB. Після спільної інкубації людських РВМС як ефекторних клітин, KPL-4 як клітин-мішеней і Her3 TCB в зростаючих концентраціях вимірювали відсоток CD69-позитивних CD8-Т-клітин за допомогою FACS через 48 год. Представлені дані за трьома повторностями з СКО;

на фіг. 31 - результати аналізу активації клітин Jurkat за допомогою CD3 через 5 год., одержані за допомогою люмінесценції. Після інкубації пухлинних клітин лінії KPL4 з репортерними клітинами Jurkat-NFAT (Е:Т 5:1 (А) або 2,5:1 (Б)) і застосовуваними в зростаючих концентраціях Her2 TCB (А) або Her3 TCB (Б) визначали активацію клітин Jurkats на основі відносних сигналів люмінесценції (RLUS) через 5 год. Величини EC₅₀ розраховували за допомогою програми Graph Pad Prism (і вони становили 34,4пМ (А) і 22пМ (Б)). Представлені дані за трьома повторностями, "вусами" позначені СКО;

на фіг. 32 - (А, Б) - результати аналізу лізису клітин, одержані на основі вивільнення ЛДГ, після інкубації Her2-позитивних клітин-мішеней ліній KPL4, N87, T47D або MDA-MB-231 з людськими РВМС як ефекторних клітин (Е:Т 10:1) і молекулою Her 2 TCB в зростаючих концентраціях протягом 25 год. (А) або 46 год. (Б). Представлені дані за трьома повторностями, "вусами" позначені СКО. Величини EC₅₀ розраховували за допомогою програми Graph Pad Prism, і вони становили: 7,5пМ (клітини KPL4), 25,6пМ (клітини N87), 30,6пМ (клітини T47D) і 59,9пМ (клітини MDA-MB-231). (В) Дані про лізис пухлинних клітин, одержані на основі вивільнення ЛДГ, після інкубації Her3-позитивних клітин KPL4 як клітин-мішеней з людськими РВМС як ефекторних клітин (Е:Т 10:1) і з застосовуваною в зростаючих концентраціях молекулою Her 3 TCB протягом 24 год. або 48 год., як зазначено. Представлені середні значення, одержані за трьома повторностями, "вусами" позначені СКО. Величини EC₅₀ розраховували за допомогою програми Graph Pad Prism, і вони становили: 2,54пМ (24 год.) і 0,53пМ (48 год.);

на фіг. 33 - результати аналізу лізису пухлинних клітин, індукованого Her3 TCB, одержані на основі активності каспази 3/7 (люмінесценція). Представлений відносний сигнал люмінесценції, який був результатом активності каспази 3/7 в клітинах-мішенях KPL-4-каспаза-3/7 GloSensor, після спільної інкубації протягом 6,5 год. з РВМС (Е:Т=10:1) і з Her3 TCB в різних зазначених концентраціях. Представлені дані за трьома повторностями з СКО. Величину EC₅₀ розраховували за допомогою програми Graph Pad Prism, і вона становила: 0,7пМ;

на фіг. 34 - ілюстрація TCB, одержаних в прикладі 4. (А) "(Fab)₂-CrossFab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в MCSP-

зв'язувальних компонентах, EE=147E, 213E; RK=123R, 124K), (Б) "(Fab)₂-CrossFab" без модифікацій зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті);

на фіг. 35 - результати аналізу методом КЕ-ДСН ТСВ з модифікаціями зарядів, одержаних в прикладі 4 (препарат після остаточної очистки): електрофореграма молекули (Fab)₂-XFab-LC007cv, що представлена на фіг. 34А. Доріжка А = невідновні умови, доріжка Б = відновні умови;

на фіг. 36 - дані при медіанній інтенсивності флуоресценції, які характеризують зв'язування молекул ТСВ з людським MCSP на клітинах MV-3 (ліворуч) або з людським CD3 на клітинах Jurkat (праворуч), одержані за допомогою протокової цитометрії. Представлені медіанні значення інтенсивності флуоресценції за трьома повторностями, включаючи СКО;

на фіг. 37 - результати аналізу лізису пухлинних клітин, одержані на основі вивільнення ЛДГ, після інкубації позитивних за людським MCSP клітин MV-3 з РВМС як ефекторних клітин (Е:Т 10:1) і застосовуваними в зростаючих концентраціях молекулами ТСВ протягом 24 год. (ліворуч) або 48 год. (праворуч). Представлені середні результати, одержані за трьома повторностями, "вусами" позначені СКО.

Детальний опис винаходу

Визначення

Поняття, що застосовуються в даному описі, мають значення, загальноприйняті в даній галузі, якщо нижче спеціально не зазначено інше.

В контексті даного опису поняття "антигензв'язувальна молекула" в найбільш широкому сенсі відноситься до молекули, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. Прикладами антигензв'язувальних молекул є імуноглобуліни і їх похідні, наприклад, фрагменти.

Поняття "біспецифічна" означає, що антигензв'язувальна молекула має здатність специфічно зв'язуватися принаймні з двома різними антигенними детермінантами. Як правило, біспецифічна антигензв'язувальна молекула містить два антигензв'язувальних сайти, кожний з яких є специфічним щодо різних антигенних детермінант. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула має здатність одночасно зв'язуватися з двома антигенними детермінантами, насамперед з двома антигенними детермінантами, які експресуються на двох різних клітинах.

В контексті даного опису поняття "валентність" означає наявність визначеної кількості антигензв'язувальних сайтів в антигензв'язувальній молекулі. Так, поняття "одновалентне зв'язування з антигеном" означає наявність одного (і не більше одного) специфічного щодо антигена антигензв'язувального сайту в антигензв'язувальній молекулі.

Поняття "антигензв'язувальний сайт" відноситься до сайту, тобто одного або декількох амінокислотних залишків антигензв'язувальної молекули, які забезпечують взаємодію з антигеном. Наприклад, антигензв'язувальний сайт антитіла містить амінокислотні залишки з гіперваріабельних ділянок (які визначають комплементарність ділянок) (CDR). Нативна молекула імуноглобуліну має, як правило, два антигензв'язувальних сайти, молекула Fab, як правило, має один антигензв'язувальний сайт.

В контексті даного опису поняття "антигензв'язувальний фрагмент" відноситься до поліпептидної молекули, яка специфічно зв'язується з антигенною детермінантою. В одному з варіантів здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент має здатність направляти субстанцію, до якої він приєднаний (наприклад, другий антигензв'язувальний фрагмент), до сайту-мішені, наприклад, до специфічного типу пухлинної клітини або строми пухлини, що несе антигенну детермінанту. В іншому варіанті здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент має здатність активувати передачу сигналів через її антиген-мішень, наприклад, антиген комплексу Т-клітинного рецептора. Антигензв'язувальні фрагменти включають антитіла і їх фрагменти, що додатково описано нижче. Конкретні антигензв'язувальні фрагменти включають антигензв'язувальний домен антитіла, який містить варіабельну область важкого ланцюга антитіла і варіабельну область легкого ланцюга антитіла. В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальні фрагменти можуть містити константні області антитіла, додатково зазначені в даному описі і відомі в даній галузі. Прийнятні константні області важких ланцюгів включають будь-яку з п'яти ізотипів: α, δ, ε, γ або μ. Прийнятні константні області легких ланцюгів включають будь-яку з двох ізотипів: κ і λ.

В контексті даного опису поняття "антигенна детермінанта" є синонімом понять "антиген" і "епітоп" і відноситься до сайту (наприклад, ділянки, що складається з суміжних амінокислот, або конформаційної конфігурації, що складається з різних областей несуміжних амінокислот) на поліпептидній макромолекулі, з якою зв'язується антигензв'язувальний фрагмент з утворенням комплексу антигензв'язувальний фрагмент-антиген. Придатні антигенні детермінанти можуть бути присутніми, наприклад, на поверхні пухлинних клітин, на поверхні інфікованих вірусом

клітин, на поверхні інших хворих клітин, на поверхні імунних клітин, клітин, що знаходяться у вільному стані в сироватці крові і/або у позаклітинному матриксі (ECM). У контексті даного опису білки, що відносяться до антигенів (наприклад, CD3), якщо не зазначено інше, можуть являти собою будь-які нативні форми білків з будь-якого застосовуваної як джерело хребетної тварини, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші і щури). В конкретному варіанті здійснення винаходу антиген являє собою людський білок. У контексті даного опису при посиленні на конкретний білок мається на увазі "повнорозмірний", непроцесований білок, а також будь-яка форма білка, одержана в результаті процесингу в клітині. Під поняття підпадають також варіанти білка, що зустрічаються в природних умовах, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти. Прикладом людського білка, придатного як антиген, є CD3, насамперед епсилон-субодиниця CD3 (див. UniProt №. P07766 (версія 130), NCBI RefSeq №. NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 для людської послідовності або UniProt № Q95LI5 (версія 49), NCBI GenBank № BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 для послідовності мавп циномоглус [Macaca fascicularis, яванський макак-крабоїд]. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонується у винаході, зв'язується з епітопом CD3 або з антигеном клітини-мішені, який є консервативним для CD3, або антигеном клітини-мішені з інших видів.

Поняття "специфічно зв'язується" означає, що зв'язування є вибірконим щодо антигена і його можна відрізнити від небажаних або неспецифічних взаємодій. Здатність антигензв'язувального фрагмента зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою, можна визначати за допомогою твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) або інших методик, які відомі спеціалісту в даній галузі, наприклад, за допомогою методики на основі поверхневого плазмонного резонансу (здійснюючи аналіз за допомогою пристрою BIACore) (Liljeblad і ін., Glyco J 17, 2000, сс. 323-329), і традиційних аналізів зв'язування (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В одному з варіантів здійснення винаходу рівень зв'язування антигензв'язувального фрагмента з неспоріднених білком становить менше ніж приблизно 10 % від рівня зв'язування антигензв'язувального фрагмента з антигеном, при вимірюванні, наприклад, за допомогою SPR. В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальний фрагмент, який зв'язується з антигеном, або антигензв'язувальна молекула, яка містить антигензв'язувальний фрагмент, характеризується величиною константи дисоціації (K_D), що становить $\leq 1\text{мкМ}$, $\leq 100\text{нМ}$, $\leq 10\text{нМ}$, $\leq 1\text{нМ}$, $\leq 0,1\text{нМ}$ або $\leq 0,001\text{нМ}$ (наприклад, 10^{-8}М або менше, наприклад, від 10^{-8}М до 10^{-13}М , наприклад, від 10^{-9}М до 10^{-13}М).

Поняття "афінність" відноситься до сумарної сили всіх нековалентних взаємодій між індивідуальним сайтом зв'язування молекули (наприклад, рецептора) і її партнера зі зв'язування (наприклад, ліганду). Якщо не зазначено інше, то в контексті даного опису поняття "афінність зв'язування" відноситься до властивої компонентів пари, що зв'язується (наприклад, антигензв'язувального фрагмента і антигена або рецептора і ліганду), афінності зв'язування, що відображає взаємодію за типом 1:1. Афінність молекули X до її партнера Y можна, як правило, характеризувати за допомогою константи дисоціації (K_D), яка являє собою відношення констант швидкості реакції дисоціації і асоціації (K_{off} і K_{on} відповідно). Так, еквівалентні афінності можуть відповідати різним константам швидкості, якщо співвідношення констант швидкості залишається таким же. Афінність можна оцінювати загальноприйнятими методами, відомими в даній галузі, включаючи методи, представлені в даному описі. Конкретним методом вимірювання афінності є метод поверхневого плазмонного резонансу (SPR).

Поняття "знижене зв'язування (знижена здатність до зв'язування)", наприклад, знижена здатність до зв'язування з Fc-рецептором, відноситься до зниження афінності при відповідній взаємодії, вимірюваної, наприклад, за допомогою SPR. Для ясності слід зазначити, що поняття включає також зниження афінності до нуля (або нижче межі виявлення аналітичного методу), тобто повну елімінацію взаємодії. І, навпаки, "підвищене зв'язування (підвищена здатність до зв'язування)" відноситься до підвищення афінності зв'язування при відповідній взаємодії.

Поняття "антиген, який активує Т-клітини" у контексті даного опису відноситься до антигенної детермінанти, що експресується на поверхні Т-лімфоцита, насамперед цитотоксичного Т-лімфоцита, що має здатність індукувати активацію Т-клітин після взаємодії з антигензв'язувальною молекулою. Зокрема, взаємодія антигензв'язувальної молекули з антигеном, який активує Т-клітини може індукувати активацію Т-клітин шляхом запуску каскаду передачі сигналів комплексу Т-клітинного рецептора. В конкретному варіанті здійснення винаходу антиген, який активує Т-клітини, являє собою CD3, насамперед епсилон-субодиницю CD3 (див. UniProt № P07766 (версія 130), NCBI RefSeq №. NP_000724.1, SEQ ID NO: 1 для людської послідовності або UniProt № Q95LI5 (версія 49), NCBI GenBank № BAB71849.1, SEQ ID NO: 2 для послідовності мавп циномоглус [Macaca fascicularis])

Поняття "Т-клітинна активація (активація Т-клітин)" у контексті даного опису відноситься до одного або декількох клітинних відповідей Т-лімфоцита, зокрема, цитотоксичного Т-лімфоцита, вибраних з: проліферації, диференціювання, секреції цитокінів, вивільнення цитотоксичних ефекторних молекул, цитотоксичної активності і експресії маркерів активації. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, мають здатність індукувати Т-клітинну активацію. Прийнятні аналізи оцінювання Т-клітинної активації, відомі в даній галузі, представлені в даному описі.

Поняття "антиген клітини-мішені" у контексті даного опису відноситься до антигенної детермінанти, яка присутня на поверхні клітини-мішені, наприклад, клітини в пухлині, такої як ракова клітина або клітина строми пухлини. В конкретному варіанті здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою CD20, насамперед людський CD20 (див. UniProt № P11836).

У контексті даного опису поняття "перший", "другий" і "третій" стосовно молекул Fab і т.д. застосовують з метою зручності розрізнення, коли присутньо більше одного типу кожного з фрагментів. Застосування цих понять не означає їх конкретний порядок або орієнтацію в біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, яка активує Т-клітини, якщо спеціально не зазначено інше.

Поняття "молекула Fab" відноситься до білка, що складається з VH і CH1-домену важкого ланцюга ("важкий ланцюг Fab") і VL і CL-домену легкого ланцюга ("легкий ланцюг Fab") імуноглобуліну.

Під поняттям "злиті" мається на увазі, що компоненти (наприклад, молекула Fab і субодиниця Fc-домену) з'єднані пептидними зв'язками, або безпосередньо, або за допомогою одного або декількох пептидних лінкерів.

В контексті даного опису поняття "одноланцюгова" відноситься до молекули, що містить амінокислотні мономери, зв'язані лінійно за допомогою пептидних зв'язків. В деяких варіантах здійснення винаходу один з антигензв'язувальних фрагментів являє собою одноланцюгову молекулу Fab, тобто молекулу Fab, в якій легкий ланцюг Fab і важкий ланцюг Fab з'єднані за допомогою пептидного лінкера з утворенням одного пептидного ланцюга. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу С-кінець легкого ланцюга Fab з'єднаний з N-кінцем важкого ланцюга Fab в одноланцюговій молекулі Fab.

Під кросовер-молекулою Fab (яку позначають також як "Crossfab") мається на увазі молекула Fab, в якій варіабельні домени важкого і легкого ланцюга Fab обмінені (тобто замінені один на одного), тобто кросовер-молекула Fab містить пептидний ланцюг, що складається із варіабельного домену легкого ланцюга VL і константного домену 1 важкого ланцюга CH1 (VL-CH1, в напрямку від N- до С-кінця), і пептидний ланцюг, що складається із варіабельного домену важкого ланцюга VH і константного домену легкого ланцюга CL (VH-CL, в напрямку від N- до С-кінця). Для простоти розуміння, слід зазначити, що в кросовер-молекулі Fab, в якій обмінені варіабельні домени легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab, пептидний ланцюг, який містить константний домен 1 важкого ланцюга CH1, позначають в контексті даного опису як "важкий ланцюг" кросовер-молекули Fab.

На противагу цьому, під "канонічною" молекулою Fab мається на увазі молекула Fab, яка має її природний формат, тобто яка містить важкий ланцюг, що складається із варіабельного і константного доменів важкого ланцюга (VH-CH1, в напрямку від N- до С-кінця), і легкий ланцюг, що складається із варіабельного і константного доменів легкого ланцюга (VL-CL, в напрямку від N- до С-кінця).

Поняття "молекула імуноглобуліну" відноситься до білка, який має структуру антитіла, що зустрічається в природних умовах. Наприклад, імуноглобуліни класу IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою приблизно 150000 Да, що складаються з двох легких ланцюгів і двох важких ланцюгів, зв'язаних дисульфідними містками. В напрямку від N-кінця до С-кінця кожний важкий ланцюг містить варіабельний домен (VH), який називають також варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким розташовані три константних домени (CH1, CH2 і CH3), які називають також константною областю важкого ланцюга. Аналогічно цьому, в напрямку від N- кінця до С-кінця кожний легкий ланцюг містить варіабельний домен (VL), який називають також варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким розташований константний домен легкого ланцюга (CL), який називають також константною областю легкого ланцюга. Важкий ланцюг імуноглобуліну може належати до одного з п'яти типів, позначених як α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) або μ (IgM), деякі з яких додатково підрозділяють на підтипи, наприклад, γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) і α_2 (IgA₂). Легкий ланцюг імуноглобуліну може належати до одного з двох типів, позначених як каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотної послідовності його

константного домену. Імуноглобулін, як правило, складається з двох молекул Fab і Fc-домену, які з'єднані через шарнірну область імуноглобуліну.

В контексті даного опису поняття "антитіло" використовується в його найбільш широкому значенні, і воно відноситься до різних структур антитіл, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) моноклональні антитіла, поліклональні антитіла і фрагменти антитіл, за умови, що вони мають необхідну антигензв'язувальну активність.

Поняття "фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінній від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка має здатність зв'язуватися з антигеном, з яким зв'язується інтактне антитіло. Прикладами фрагментів антитіл є (але, не обмежуючись тільки ними) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерні антитіла, лінійні антитіла, одноланцюгові молекули антитіл (наприклад, scFv) і однокласні антитіла. Огляд деяких фрагментів антитіл див., наприклад, у Hudson і ін., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Огляд scFv-фрагментів див., наприклад, у Plückthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, під ред. Rosenberg і Moore, в-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315; див. також WO 93/16185; і US №№ 5571894 і 5587458. Обговорення Fab- і F(ab')₂-фрагментів, які містять залишки епітопа, що зв'язується з рецептором порятунку, і мають подовжений час напівжиття in vivo, див. в US № 5869046. Димерні антитіла являють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язувальними сайтами, які можуть бути двовалентними або біспецифічними (див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson і ін., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134; і Hollinger і ін., Proc Natl Acad Sci USA 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерні (триабоді) і тетрамерні (тетрабоді) антитіла описані також у Hudson і ін., Nat Med 9, 2003, сс. 129-134. Однокласні антитіла являють собою фрагменти антитіл, які містять весь або частину варіабельного домену важкого ланцюга або весь або частину варіабельного домену легкого ланцюга антитіла. В деяких варіантах здійснення винаходу однокласне антитіло являє собою людське однокласне антитіло (фірма Domantis, Inc., Уолтем, шт. Массачусетс; див., наприклад, US № 6248516 B1). Фрагменти антитіл можна створювати за допомогою різних методик, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також одержувати з використанням рекомбінантних клітин-хазяїв (наприклад, E. coli або фага), як зазначено в даному описі.

Поняття "антигензв'язувальний домен" відноситься до частини антитіла, яка містить область, що специфічно зв'язується і є комплементарною частині антигена або повному антигену. Антигензв'язувальний домен може являти собою, наприклад, один або декілька варіабельних доменів антитіла (які називають також варіабельними областями антитіла). Насамперед антигензв'язувальний домен містить варіабельну область легкого ланцюга (VL) антитіла і варіабельну область важкого ланцюга (VH) антитіла.

Поняття "варіабельна область" або "варіабельний домен" відноситься до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який бере участь у зв'язуванні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL відповідно) нативного антитіла, як правило, мають подібні структури, при цьому кожний домен містить чотири консервативних каркасних ділянки (FR) і три гіперваріабельних ділянки (HVR) (див., наприклад, Kindt і ін., Kuby Immunology, 6-те вид., в-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- або VL-домену може бути достатньо для забезпечення специфічності зв'язування антигена.

Поняття "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" у контексті даного опису відноситься до кожної з ділянок варіабельного домену антитіла, послідовності яких є гіперваріабельними, і/або які утворюють структури у вигляді петель ("гіперваріабельні петлі"). Як правило, нативні чотириланцюгові антитіла містять шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). HVR, як правило, містять амінокислотні залишки з гіперваріабельних петель і/або з "ділянок, які визначають комплементарність" (CDR), останні відрізняються найбільш вираженою варіабельністю послідовності і/або беруть участь в розпізнаванні антигенів. Крім CDR1, присутнього в VH, CDR, як правило, містять амінокислотні залишки, які утворюють гіперваріабельні петлі. Поняття "гіперваріабельні ділянки" (HVR) також відноситься до "ділянок, що визначають комплементарність" (CDR), і у контексті даного опису ці поняття використовуються взаємозамінно щодо положень варіабельної області, які формують антигензв'язувальні області. Ця конкретна область описана у Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., в-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 і у Chothia і ін., J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917, причому ці визначення відносяться до амінокислотних залишків, що перекриваються, або піднаборів амінокислотних залишків при їх порівнянні один з одним. Однак у контексті даного опису мається на увазі можливість застосування будь-якого визначення CDR антитіла або його варіантів. Відповідні амінокислотні залишки, з яких складаються CDR, як вони визначені в кожному з процитованих вище посилань, представлені у порівнянні нижче в таблиці 1. Точні номери залишків, які утворюють конкретну

CDR, можуть варіюватися залежно від послідовності та розміру CDR. Спеціалісти в даній галузі на основі даних при амінокислотні послідовності варіабельної області антитіла легко можуть визначати, які залишки входять до конкретної CDR. У контексті даного опису послідовності CDR, як правило, пронумеровані відповідно до Кебота.

5

Таблиця 1

Визначення CDR¹

	Кебот	Хотіа	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-32
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ Нумерація всіх залишків, що входять до CDR, в таблиці 1 дана відповідно до номенклатури, запропонованої Кеботом зі співавторами (див. нижче).

² Позначення "AbM" з прописною літерою "b", використане в таблиці 1, відноситься до CDR, як вони визначені програмою для моделювання антитіл "AbM" компанії Oxford Molecular Group

Кебот зі співавторами запропонували також систему нумерації (номенклатуру) послідовностей варіабельних областей, яку можна застосовувати для будь-якого антитіла. Звичайний спеціаліст в даній галузі може однозначно застосовувати цю систему "нумерації за Кеботом" до будь-якої послідовності варіабельної області, не маючи ніяких експериментальних даних, крім відомостей про саму послідовності. В контексті даного опису поняття "нумерація за Кеботом" відноситься до системи нумерації, описаній у Kabat і ін., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., в-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Якщо не зазначено інше, то посилання на нумерацію положень конкретних амінокислотних залишків в варіабельної області антитіла надані відповідно до системи нумерації за Кеботом. У контексті даного опису амінокислотні положення у всіх константних областях і доменах важкого ланцюга і легкого ланцюга нумерують відповідно до системи нумерації за Кеботом, описаної у Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., в-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 і у контексті даного опису позначають як "нумерація відповідно до Кебота" або "нумерація за Кеботом". Зокрема, систему нумерації за Кеботом (див. сс. 647-660 в Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., в-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991), застосовують для константного домену легкого ланцюга CL каппа- і лямбда-ізотипу, а систему нумерації на основі EU-індексу Кебота (див. сс. 661-723) застосовують для константних доменів важкого ланцюга (CH1, шарнір, CH2 і CH3, яку у контексті даного опису для більшої ясності позначають в цьому випадку як "нумерація відповідно до EU-індексу Кебота").

Нумерація поліпептидних послідовностей в "Переліку послідовностей" не являє собою нумерацію відповідно до системи Кебота. Однак в компетенції звичайного спеціаліста в даній галузі є перетворення нумерації послідовностей в "Переліку послідовностей" в нумерацію за Кеботом.

"Каркасні ділянки" або "FR"-ділянки являють собою залишки варіабельних доменів, відмінні від залишків гіперваріабельних ділянок (HVR). FR варіабельного домену, як правило, представлені чотирма FR-доменами: FR1, FR2, FR3 і FR4. Таким чином, послідовності HVR і FR, як правило, розташовані в V_H (або V_L) в наступному порядку: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Поняття "клас" антитіла або імуноглобуліну відноситься до типу константного домену або константною області, який/яка входить до важкого ланцюга. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, а деякі з них можна додатково підрозділяти на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Константні домени важких ланцюгів, що відповідають різним класам імуноглобулінів, позначають як α, δ, ε, γ і μ відповідно.

В контексті даного опису поняття "Fc-домен" або "Fc-область" відноситься до C-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить принаймні частину константної області. Поняття відноситься до нативної послідовності Fc-областей і варіантів Fc-областей. Хоча

пограничні послідовності Fc-області в важкому ланцюзі IgG можуть злегка варіюватися, як правило, Fc-область важкого ланцюга людського IgG простягається від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак антитіла, що продукуються клітинами-хазяями, можуть піддаватися пост-трансляційному розщепленню однієї або декількох, насамперед однієї або двох амінокислот, починаючи з С-кінця важкого ланцюга. Таким чином, антитіло, що продукується клітиною-хазяїном шляхом експресії конкретної молекули нуклеїнової кислоти, що кодує повнорозмірний важкий ланцюг, може включати повнорозмірний важкий ланцюг або може включати розщеплений варіант повнорозмірного важкого ланцюга (який у контексті даного опису позначають також як "розщеплений варіант важкого ланцюга"). Це може являти собою випадок, коли кінцеві дві М-кінцеві амінокислоти важкого ланцюга являють собою гліцин (G446) і лізин (K447, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В результаті С-кінцевий лізин (Lys447) або С-кінцевий гліцин (Gly446) і лізин (K447) Fc-області може бути присутнім або відсутнім. Амінокислотні послідовності важких ланцюгів, які включають Fc-домени (або субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі), наведені в даному описі без С-кінцевого гліцин-лізинового дипептиду, якщо не зазначено інше. В одному з варіантів здійснення винаходу важкий ланцюг, що включає субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі, яка входить до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, містить додатковий С-кінцевий гліцин-лізиновий дипептид (G446 і K447, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з варіантів здійснення винаходу важкий ланцюг, що включає субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі, яка входить до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, містить додатковий С-кінцевий залишок гліцину (G446, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). Композиції, пропоновані у винаході, такі як фармацевтичні композиції, зазначені в даному описі, містять популяцію біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході. Популяція біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході, може містити молекули з повнорозмірним важким ланцюгом і молекули з розщепленим варіантом важкого ланцюга. Популяція біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході, може складатися з суміші молекул з повнорозмірним важким ланцюгом і молекул з розщепленим варіантом важкого ланцюга, в якій принаймні 50 %, принаймні 60 %, принаймні 70 %, принаймні 80 % або принаймні 90 % біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини має розщеплений варіант важкого ланцюга. В одному з варіантів здійснення винаходу композиція, яка містить популяцію біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході, містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, з важким ланцюгом, яка включає субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі, з додатковим С-кінцевим гліцин-лізиновим дипептидом (G446 і K447, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з варіантів здійснення винаходу композиція, яка містить популяцію біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході, містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, з важким ланцюгом, яка включає субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі, з додатковим С-кінцевим залишком гліцину (G446, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначена композиція містить популяцію біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході, яка містить молекули з важким ланцюгом, які включають субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі; молекули з важким ланцюгом, які включають субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі, з додатковим С-кінцевим залишком гліцину (G446, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і молекули з важким ланцюгом, які включають субодиницю Fc-домену, зазначену в даному описі з додатковим С-кінцевим гліцин-лізиновим дипептидом (G446 і K447, нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). Якщо спеціально не зазначено інше, нумерація амінокислотних залишків в Fc-області або константній області відповідає системі нумерації EU, яку позначають також як EU-індекс, описаний у Kabat і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., в-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 (див. також вище). Поняття "субодиниця" Fc-домену у контексті даного опису відноситься до одного з двох поліпептидів, які утворюють димерний Fc-домен, тобто до поліпептиду, який містить С-кінцеві константні області важкого ланцюга імуноглобуліну, що мають здатність до стабільної самоасоціації. Наприклад, субодиниця Fc-домену IgG містить константний домен CH2 IgG і CH3 IgG.

"Модифікація, яка підсилює асоціацію першої і другої субодиниць Fc-домену" являє собою маніпуляцію з пептидним каркасом або пост-трансляційні модифікації субодиниці Fc-домену, які зменшують або перешкоджають асоціації поліпептиду, що містить субодиницю Fc-домену, з

ідентичним поліпептидом з утворенням гомодимеру. У контексті даного опису модифікація, яка підсилює асоціацію, включає, насамперед, різні модифікації, які здійснюються з кожною з двох субодиниць Fc-домену, призначених для асоціації (тобто першою і другою субодиниць Fc-домену), при цьому, модифікації доповнюють одна одну таким чином, щоби посилювати асоціацію двох субодиниць Fc-домену. Наприклад, модифікація, яка підсилює асоціацію, може змінювати структуру або заряд однієї або обох субодиниць Fc-домену таким чином, щоби покращувати їх асоціацію стерично або електростатично, відповідно. Так, (гетеро)димеризація має місце між поліпептидом, який містить першу субодиницю Fc-домену, і поліпептидом, який містить другу субодиницю Fc-домену, які можуть бути неідентичними, оскільки додаткові компоненти, злиті з кожною з субодиниць (наприклад, антигензв'язувальні фрагменти), не є однаковими. В деяких варіантах здійснення винаходу модифікація, яка підсилює асоціацію, являє собою амінокислотну мутацію в Fc-доміні, зокрема, амінокислотну заміну. В конкретному варіанті здійснення винаходу модифікація, яка підсилює асоціацію, являє собою індивідуальну амінокислотну мутацію, зокрема, амінокислотну заміну, в кожній з двох субодиниць Fc-домену.

Поняття "ефекторні функції", що використовується в даному описі, відноситься до видів біологічної активності, властивим Fc-області антитіла, які варіюються залежно від ізотипу антитіла. Прикладами ефекторних функцій антитіла є: здатність зв'язуватися з C1q і комплементозалежна цитотоксичність (CDC), здатність зв'язуватися з Fc-рецептором, антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC), антитіло-обумовлений клітиннозалежний фагоцитоз (ADCP), секреція цитокінів, опосередковане імунним комплексом поглинання антигена антигенпрезентуючими клітинами, знижувальна регуляція рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора); і активація B-клітин.

У контексті даного опису мається на увазі, що поняття "конструювання, сконструйований, інженерія" включають будь-яку маніпуляцію з пептидним каркасом або пост-трансляційні модифікації поліпептиду або його фрагмента, що зустрічається в природних умовах або рекомбінантного. Інженерія включає модифікації амінокислотної послідовності, схеми глікозилювання або групи бічних ланцюгів індивідуальних амінокислот, а також комбінації зазначених підходів.

У контексті даного опису мається на увазі, що поняття "амінокислотна мутація" відноситься до амінокислотних замін, делецій, інсерцій і модифікацій. Можна застосовувати будь-яку комбінацію заміни, делеції, інсерції і модифікації для створення кінцевої конструкції за умови, що кінцева конструкція має необхідні характеристики, наприклад, знижену здатність зв'язуватися з Fc-рецептором або підвищену асоціацію з іншим пептидом. Амінокислотна послідовність з делеціями і інсерціями включає аміно- і/або карбоксикінцеві делеції і інсерції амінокислот. Конкретними амінокислотними мутаціями є амінокислотні заміни. Для зміни, наприклад, характеристик зв'язування Fc-області, найбільш кращими є неконсервативні амінокислотні заміни, тобто заміна однієї амінокислоти на іншу амінокислоту, яка має інші структурні і/або хімічні властивості. Амінокислотні заміни включають заміну на амінокислоти, що не зустрічаються в природних умовах, або на похідні двадцяти стандартних амінокислот, що зустрічаються в природних умовах (наприклад, на 4-гідроксипролін, 3-метилгістидин, орнітин, гомосерин, 5-гідроксилізін). Амінокислотні мутації можна створювати за допомогою генетичних або хімічних методів, добре відомих в даній галузі. Генетичні методи можуть включати сайтспрямований мутагенез, ПЛР, синтез генів і т.п. Мається на увазі, що можна застосовувати також методи зміни бічної групи амінокислоти, відмінні від методів генетичної інженерії, такі як хімічна модифікація. Для позначення однієї і тієї ж амінокислотної мутації можна використовувати різні позначення. Наприклад, заміну проліну в положенні 329 Fc-домену на гліцин можна позначати як 329G, G329, G₃₂₉, P329G або Pro329Gly.

В контексті даного опису поняття "поліпептид" відноситься до молекули, що складається з мономерів (амінокислот), лінійно зв'язаних амідними зв'язками (які позначають також як пептидні зв'язки). Поняття "поліпептид" відноситься до будь-якого ланцюга, що складається з двох або більшої кількості амінокислот, і не означає, що продукт має конкретну довжину. Так, пептиди, дипептиди, трипептиди, олігопептиди, "білок", "амінокислотний ланцюг" або будь-яке інше прийняте поняття, що відноситься до ланцюга, що складається з двох або більшої кількості амінокислот, всі підпадають під визначення "поліпептид", і поняття "поліпептид" можна застосовувати замість або взаємозамінно з будь-яким із зазначених понять. Мається на увазі також, що поняття "поліпептид" відноситься до продуктів, які несуть пост-експресійні модифікації поліпептиду, включаючи (але, не обмежуючись тільки ними) глікозилювання, ацетилювання, фосфорилювання, амідування, дериватизацію з використанням відомих захисних/блокуючих груп, протеолітичне розщеплення або модифікацію за допомогою амінокислот, що не зустрічаються в природних умовах. Поліпептид можна одержувати з

біологічного джерела, що зустрічається в природних умовах, або можна одержувати за допомогою технології рекомбінантної ДНК, і його не обов'язково транслювати зі створеної нуклеотидної послідовності. Його можна створювати будь-яким шляхом, включаючи хімічний синтез. Поліпептид, пропонований у винаході, може складатися приблизно з 3 або більше, 5 або більше, 10 або більше, 20 або більше, 25 або більше, 50 або більше, 75 або більше, 100 або більше, 200 або більше, 500 або більше, 1000 або більше або 2000 або більше амінокислот. Поліпептиди можуть мати різну тривимірну структуру, хоча вони необов'язково повинні мати зазначену структуру. Поліпептиди з визначеною тривимірною структурою позначають як поліпептиди, що мають укладку, а поліпептиди, які не мають визначену тривимірну структуру, але які можуть легше адаптуватися до великої кількості різних конформацій, позначають як поліпептиди, не що мають укладки.

Під "виділеним" поліпептидом або його варіантом, або похідною мають на увазі поліпептид, який не знаходиться в його природному оточенні. При цьому не вимагається наявності будь-якого конкретного рівня очистки. Наприклад, виділений поліпептид можна видаляти з його нативного або природного оточення. Одержані шляхом рекомбінації поліпептиди і білки, що експресуються в клітинах-хазяях, розглядаються як виділені для цілей даного винаходу, якщо вони являють собою нативні або рекомбінантні поліпептиди, які відокремлені, фракціоновані або частково або повністю очищені за допомогою будь-якого прийнятного методу.

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" відносно поліпептидній референс-послідовності визначають як відсоток амінокислотних залишків в послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотним залишкам в поліпептидній референс-послідовності, після вирівнювання послідовностей і інтродукції за необхідності прогалін для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей, і при цьому будь-які консервативні заміни не враховуються під час оцінювання ідентичності послідовностей. Порівняльний аналіз для визначення відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей можна здійснювати різними шляхами, які знаходяться в компетенції спеціаліста в даній галузі, наприклад, з використанням публічно доступних комп'ютерних програм, таких як програма BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Спеціалісти в даній галузі можуть визначати відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання за всією довжиною порівнюваних послідовностей. Однак для цілей даного винаходу величину % ідентичності амінокислотних послідовностей отримують з використанням призначеної для порівняння послідовностей комп'ютерної програми ALIGN-2. Призначена для порівняння послідовностей комп'ютерна програма ALIGN-2 розроблена фірмою Genentech, Inc., і вихідний код поміщений на зберігання разом з документацією для користувача в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, де він зареєстрований під реєстраційним номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Програма ALIGN-2 являє собою публічно доступну програму фірми Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, шт. Каліфорнія, або її можна компілювати з вихідного коду. Програму ALIGN-2 можна компілювати для застосування в операційній системі UNIX, включаючи цифрову версію UNIX V4.0D. В програмі ALIGN-2 всі параметри для порівняння послідовностей є заданими і не повинні змінюватися. В ситуаціях, коли ALIGN-2 застосовують для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотних послідовностей даної амінокислотної послідовності А відносно або у порівнянні з даною амінокислотною послідовністю Б (яку іншими словами можна позначати як дана амінокислотна послідовність А, яка має або відрізняється визначеним % ідентичності амінокислотної послідовності відносно або у порівнянні з даною амінокислотною послідовністю Б), розраховують наступним чином:

$$100 \times \text{частка } X/Y,$$

де Х позначає кількість амінокислотних залишків, оцінених програмою порівняльного аналізу послідовностей ALIGN-2 як ідентичні збіги під час порівняльного аналізу послідовностей А і Б за допомогою зазначеної програми, і де Y позначає загальну кількість амінокислотних залишків в Б. Повинно бути очевидно, що, коли довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності Б, то % ідентичності амінокислотної послідовності А відносно амінокислотної послідовності Б не повинен бути рівним % ідентичності амінокислотної послідовності Б відносно амінокислотної послідовності А. Якщо спеціально не зазначено інше, то у контексті даного опису всі величини % ідентичності амінокислотних послідовностей отримують відповідно до процедури, описаній в останньому з попередніх параграфів, за допомогою комп'ютерної програми ALIGN-2.

Поняття "полінуклеотид" відноситься до виділеної молекули нуклеїнової кислоти або конструкції, наприклад, матричної РНК (мРНК), РНК вірусного походження або плазмідної ДНК (пДНК). Полінуклеотид може містити звичайний фосфодієфірний зв'язок або нетрадиційний

зв'язок (наприклад, амідний зв'язок, такий, який присутній в пептидних нуклеїнових кислотах (ПНК)). Поняття "молекула нуклеїнової кислоти" відноситься до будь-якого одного або декількох сегментів нуклеїнової кислоти, наприклад, фрагментів ДНК або РНК, які присутні в полінуклеотиді.

Під "виділеною" молекулою нуклеїнової кислоти або полінуклеотидом мається на увазі молекула нуклеїнової кислоти, тобто ДНК або РНК, яка відокремлена від її нативного оточення. Наприклад, рекомбінантний полінуклеотид, який кодує поліпептид, що входить до вектора, розглядається як виділений для цілей даного винаходу. Іншими прикладами виділеного полінуклеотиду є рекомбінантні полінуклеотиди, присутні в гетерологічних клітинах-хазяях, або очищені (частково або повністю) полінуклеотиди, що знаходяться в розчині. Виділений полінуклеотид включає молекулу полінуклеотиду, що входить до клітини, які в нормі містять молекулу полінуклеотиду, але молекула полінуклеотиду присутня поза хромосомою або має локалізацію в хромосомі, відмінну від її локалізації в хромосомі в природних умовах. Виділені молекули РНК включають одержані *in vivo* або *in vitro* РНК-транскрипти, пропонувані в даному винаході, а також форми з позитивним і негативним ланцюгом і дволанцюгові форми. Виділені полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти, пропонувані в даному винаході, включають також зазначені молекули, одержані за допомогою синтезу. Крім того, полінуклеотид або нуклеїнова кислота може являти собою регуляторний елемент або може включати регуляторний елемент, такий як промотор, сайт зв'язування рибосом або термінатор транскрипції.

Під нуклеїновою кислотою або полінуклеотидом, яка/який має нуклеотидну послідовність, яка, наприклад, на 95 % "ідентична" нуклеотидній референс-послідовності, пропонуваної в даному винаході, мається на увазі, що нуклеотидна послідовність полінуклеотиду ідентична референс-послідовності за винятком того, що полінуклеотидна послідовність може включати аж до 5 точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів нуклеотидної референс-послідовності. Іншими словами, для одержання полінуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність, яка ідентична принаймні на 95 % нуклеотидної референс-послідовності, аж до 5 % нуклеотидів в референс-послідовності можна вилучати шляхом делеції або замінювати на інший нуклеотид, або аж до 5 % нуклеотидів від загальної кількості нуклеотидів в референс-послідовності можна вбудовувати в референс-послідовність. Ці зміни референс-послідовності можуть мати місце в положеннях на 5'- або 3'-кінці нуклеотидної референс-послідовності або в іншому положенні між цими кінцевими положеннями, і їх вбудовують або індивідуально між залишками в референс-послідовності, або їх вбудовують в референс-послідовність у вигляді однієї або декількох суміжних груп. На практиці вирішення питання про те, чи ідентична конкретна полінуклеотидна послідовність принаймні на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % нуклеотидній послідовності, пропонуваній в даному винаході, можна вирішувати, як правило, з використанням відомих комп'ютерних програм, наприклад, зазначених вище для поліпептидів (наприклад, ALIGN-2).

Поняття "касета експресії" відноситься до полінуклеотиду, одержаного за допомогою рекомбінації або синтезу, який містить серії специфічних нуклеотидних елементів, які забезпечують транскрипцію конкретної нуклеїнової кислоти в клітині-мішені. Рекомбінантну касету експресії можна вбудовувати в плазмід, хромосому, мітохондріальну ДНК, плазмідну ДНК, вірус або фрагмент нуклеїнової кислоти. Як правило, рекомбінантна касета експресії, яка являє собою частину експресійної вектора, включає серед інших послідовностей нуклеотидну послідовність, що підлягає транскрипції, і промотор. В деяких варіантах здійснення винаходу касета експресії, пропонувана у винаході, містить полінуклеотидні послідовності, які кодують біспецифічні антигензв'язувальні молекули, пропонувані у винаході, або їх фрагменти.

Поняття "вектор" або "експресійний вектор" є синонімом поняття "експресійна конструкція" і відноситься до молекули ДНК, яку застосовують для інтродукції і забезпечення експресії конкретного гена, з якою він функціонально зв'язаний в клітині-мішені. Поняття включає вектор, що являє собою структуру нуклеїнової кислоти, здатну до самореплікації, а також вектор, вбудований в геном клітини-хазяїна, в яку він інтродукований. Експресійний вектор, пропонуваний в даному винаході, містить касету експресії. Експресійні вектори дозволяють здійснювати транскрипцію стабільної мРНК у великих кількостях. Коли експресійний вектор знаходиться всередині клітини-мішені, то молекула рибонуклеїнової кислоти або білок, який кодується геном, продукується в результаті клітинного механізму транскрипції і/або трансляції. В одному з варіантів здійснення винаходу експресійний вектор, пропонуваний у винаході, містить касету експресії, яка включає полінуклеотидні послідовності, які кодують біспецифічні антигензв'язувальні молекули, пропонувані у винаході, або їх фрагменти.

У контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн", "лінії клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються взаємозамінно, і вони відносяться до клітин, в які інтродукована

екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство зазначених клітин. До клітин-хазяїв відносяться "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинні трансформовані клітини, а також потомство, що походить з них, незалежно від кількості пересівань. Потомство може не бути строго ідентичним батьківській клітині за складом нуклеїнових кислот, а може нести мутації. Під дане поняття підпадає мутантне потомство, яке має таку ж функцію або біологічну активність, що й відібрана шляхом скринінгу або селекції вихідна трансформована клітина. Клітина-хазяїн являє собою будь-який тип клітинної системи, яку можна застосовувати для створення біспецифічних антигензв'язувальних молекул, пропонує в даному винаході. Клітини-хазяї включають культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) CHO-клітини, BHK-клітини, NS0-клітини, SP2/0-клітини, клітини мієломи лінії YO, клітини мишачої мієломи лінії РЗ × 63, PER-клітини, PER.C6-клітини або клітини гібридами, клітини дріжджів, клітини комах і клітини рослин, але також клітини, що знаходяться в трансгенній тварині, трансгенній рослині або в культивованій рослинній або тваринній тканині.

"Активуючий Fc-рецептор" являє собою Fc-рецептор, який після взаємодії з Fc-доменом антитіла здійснює процес передачі сигналів, які стимулюють клітину, що несе рецептор, здійснювати ефекторні функції. Людські активуючі Fc-рецептори включають FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) і FcαRI (CD89).

Антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC) являє собою імунний механізм, який приводить до лізису сенсibiliзованих антитілом клітин-мішеней імунними ефекторними клітинами. Клітини-мішені являють собою клітини, з якими антитіла або їх похідні, які містять Fc-область, специфічно зв'язуються, як правило, через область білка, яка є N-кінцевою відносно Fc-області. В контексті даного опису поняття "знижена ADCC" відноситься або до зниження кількості лізованих в даний момент часу клітин-мішеней при даній концентрації антитіла в середовищі, що оточує клітини-мішені, шляхом зазначеного вище механізму ADCC, і/або до підвищення концентрації антитіла в середовищі, що оточує клітини-мішені, що необхідно для досягнення лізису даної кількості клітин-мішеней в даний час за допомогою механізму ADCC. Зниження ADCC-активності визначають відносно ADCC, опосередкованої таким же антитілом, яке одержане за допомогою такого ж типу клітин-хазяїв з використанням однакових стандартних методів одержання, очистки, приготування композицій і зберігання (які відомі спеціалістам в даній галузі), але яке не піддавали інженерії. Наприклад, зниження ADCC, опосередкованої антитілом, яке містить в його Fc-домени амінокислотну заміну, яка знижує ADCC, визначають відносно ADCC, опосередкованої таким же антитілом без зазначеної амінокислотної заміни в Fc-домени. Прийнятні аналізи оцінювання ADCC добре відомі в даній галузі (див., наприклад, публікацію PCT WO 2006/082515 або публікацію PCT WO 2012/130831).

Поняття "ефективна кількість" агента відноситься до кількості, яка потрібна для забезпечення фізіологічної зміни в клітині або тканині, в яку її вводять.

Поняття "терапевтично ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції, відноситься до кількості, ефективній при застосуванні в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення необхідного терапевтичного або профілактичного результату. Терапевтично ефективна кількість агента, наприклад, елімінує, знижує, уповільнює, мінімізує або попереджає небажані явища захворювання.

"Індивідуум" або "суб'єкт" являє собою ссавця. Ссавці являють собою (але, не обмежуючись тільки ними) одомашнених тварин (наприклад, корови, вівці, кішки, собаки і коні), приматів (наприклад, люди і примати, крім людини, такі як мартини), кроликів і гризунів (наприклад, миші і щури). Переважно індивідуум або суб'єкт являє собою людину.

Поняття "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який знаходиться в такій формі, що він забезпечує біологічну активність діючої речовини, яка входить до його складу і повинна мати ефективність, і який не містить додаткових компонентів, що мають неприйнятну токсичність для індивідуума, якому слід вводити композицію.

"Фармацевтично прийнятний носій" відноситься до інгредієнта в фармацевтичній композиції, відмінного від діючої речовини, який є нетоксичним для індивідуума. Фармацевтично прийнятні носії включають (але, не обмежуючись тільки ними) буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант.

В контексті даного опису поняття "лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "процес лікування") відноситься до клінічного втручання з метою зміни природного перебігу хвороби у індивідуума, що підлягає лікуванню, і його можна здійснювати або для профілактики, або в процесі розвитку клінічної патології. Необхідними діями лікування є (але, не обмежуючись тільки ними) попередження виникнення або рецидиву хвороби, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або опосередкованих патологічних наслідків хвороби,

попередження метастазів, зниження швидкості розвитку хвороби, полегшення або тимчасове послаблення хворобливого стану і ремісія або покращення прогнозу. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, застосовують для затримки розвитку хвороби або уповільнення прогресування хвороби.

Поняття "листівка-вкладиш в упаковку" у контексті даного опису відноситься до інструкцій, які звичайно поміщують в упаковки терапевтичних продуктів, що надходять у продаж, та які містять інформацію про показання, застосування, дозу, шляхи введення, комбіновану терапію, протипоказання і/або міри обережності під час застосування зазначених терапевтичних продуктів.

Докладний опис варіантів здійснення винаходу

У винаході запропонована біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, з кращими властивостями для терапевтичного застосування, насамперед з покращеною технологічністю (наприклад, стосовно чистоти, виходу). Амінокислотні заміни в молекулах Fab, що входять до біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, є найбільш ефективними щодо зниження помилкового спарювання легких ланцюгів з невідповідними важкими ланцюгами (побічні продукти, що утворилися у результаті взаємодії бенс-джонсовського типу), що може мати місце при одержанні на основі Fab бі-/мультиспецифічних антигензв'язувальних молекул з VH/VL-обміном в одному (або в більшій кількості у випадку молекул, які містять більше двох антигензв'язувальних молекул Fab) з їх зв'язувальних плечей (див. також публікацію РСТ/EP2015/057165, насамперед наведені у ній приклади, яка повністю включена у даний опис як посилання).

Першим об'єктом винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, та містить

(а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном;

(б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном, і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab замінені один на одного;

де перший антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини, а другий антиген являє собою антиген клітини-мішені, або перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини; і в якій

I) в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена на позитивно заряджену амінокислоту (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена на негативно заряджену амінокислоту (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); або

II) в константному домені CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 124 замінена на позитивно заряджену амінокислоту (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена на негативно заряджену амінокислоту (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

Відповідно до винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, не містить обидві модифікації, зазначені в I) і II). Константні домени CL і CH1 другої молекули Fab не замінені один на одного (тобто залишаються необміненими).

В одному з варіантів біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 або амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В іншому варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В конкретному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули

Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)) і амінокислота в положенні 123 замінена незалежно на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в
 5 одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (K) або аргінін (R)), і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до
 10 EU-індексу Кебота).

В більш конкретному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на лізин (K) або аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота) і амінокислота в положенні 123 замінена на аргінін (R) (нумерація відповідно до Кебота), і в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), амінокислота в положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В конкретних варіантах здійснення винаходу константний домен CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), відноситься до каппа-ізотипу.

Альтернативно цьому, амінокислотні заміни, зазначені в наведених вище варіантах здійснення винаходу, можуть бути зроблені в константному домені CL і в константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), замість константного домену CL і константного домену CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а).

В конкретних варіантах здійснення винаходу константний домен CL другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), відноситься до каппа-ізотипу.

Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, може містити додатково третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном. В конкретних варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab ідентична першій молекулі Fab, зазначеній у підпункті а). Відповідно до цих варіантів здійснення винаходу амінокислотні заміни, зазначені в наведених вище варіантах здійснення винаходу, можуть бути зроблені в константному домені CL і константному домені CH1 як першої молекули Fab, так і третьої молекули Fab. Альтернативно цьому, амінокислотні заміни, зазначені в наведених вище варіантах здійснення винаходу, можуть бути зроблені в константному домені CL і константному домені CH1 другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), але не в константному домені CL і константному домені CH1 першої молекули Fab і третьої молекули Fab.

В конкретних варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, додатково містить Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, які мають здатність до стабільної асоціації.

Формати біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини

Компоненти біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, можна зливати один з одним в різних конфігураціях. Приклади конфігурацій представлені на фіг. 1.

В конкретних варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до стабільної асоціації.

В деяких варіантах здійснення друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену.

В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої і другої молекули Fab, Fc-домену, що складається з першої і другої субодиниць, і необов'язково з одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, а друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з

N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1E і 1I. Необов'язково легкий ланцюг Fab першої молекули Fab і легкий ланцюг Fab другої молекули Fab можуть бути додатково злиті один з одним.

В іншому зазначеному варіанті здійснення винаходу перша молекула Fab злита на C-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої і другої молекули Fab, Fc-домену, що складається з першої і другої субодиниць, і необов'язково з одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перша і друга молекули Fab кожна злита на C-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1A і 1G. Перша і друга молекули Fab можуть бути злиті з Fc-доменом безпосередньо або через пептидний лінкер. В конкретному варіанті здійснення винаходу перша і друга молекули Fab кожна злита з Fc-доменом через шарнірну область імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу шарнірна область імуноглобуліну являє собою шарнірну область людського IgG₁, насамперед, коли Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁.

В інших варіантах здійснення винаходу перша молекула Fab злита на C-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену.

В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу друга молекула Fab злита на C-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої і другої молекули Fab, Fc-домену, що складається з першої і другої субодиниць, і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій друга молекула Fab злита на C-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, а перша молекула Fab злита на C-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1E і 1I. Необов'язково легкий ланцюг Fab першої молекули Fab і легкий ланцюг Fab другої молекули Fab можуть бути додатково злиті один з одним.

Молекули Fab можуть бути злиті з Fc-доменом або одна з одною безпосередньо або через пептидний лінкер, що містить одну або декілька амінокислот, як правило, приблизно 2-20 амінокислот. Пептидні лінкери відомі в даній галузі і представлені в даному описі. Прийнятні неімуногенні пептидні лінкери включають, наприклад, пептидні лінкери $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$, $(G_4S)_n$ або $G_4(SG_4)_n$. "n" позначає звичайно число від 1 до 10, як правило, від 2 до 4. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер являє собою пептид з амінокислотною послідовністю, що складається принаймні з 5 амінокислот, в одному з варіантів здійснення, що складається з 5-100, ще у одному варіанті здійснення винаходу, що складається з 10-50 амінокислот. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер являє собою $(G_xS)_n$ або $(G_xS)_nG_m$, де G позначає гліцин, S позначає серин і $(x=3, n=3, 4, 5 \text{ або } 6 \text{ і } m=0, 1, 2 \text{ або } 3)$ або $(x=4, n=2, 3, 4 \text{ або } 5 \text{ і } m=0, 1, 2 \text{ або } 3)$, в одному з варіантів здійснення винаходу $x=4$ і $n=2$ або 3, в іншому варіанті здійснення винаходу $x=4$ і $n=2$. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначений пептидний лінкер являє собою $(G_4S)_2$. Найбільш прийнятним пептидним лінкером для злиття легких ланцюгів Fab першої і другої молекули Fab один з одним є $(G_4S)_2$. Наведений як приклад лінкер, який можна застосовувати для з'єднання важких ланцюгів Fab першого і іншого Fab-фрагментів, містить послідовність (D)-(G₄S)₂ (SEQ ID NO: 11 і 12). Крім того, лінкери можуть містити шарнірну область імуноглобуліну (її частину). Зокрема, коли молекулу Fab зливають з N-кінцем субодиниці Fc-домену, то її можна зливати через шарнірну область імуноглобуліну або її частину за допомогою додаткового пептидного лінкера або без нього.

Біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, з одним антигензв'язувальним фрагментом (таку як молекула Fab), яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені (наприклад, представлену на фіг. 1A, Г, Е, Є, І, І), можна застосовувати, зокрема у випадках, в яких можна очікувати інтерналізації антигена клітини-мішені після зв'язування антигензв'язувального фрагмента, що має високу афінність. У таких випадках присутність більше одного антигензв'язувального фрагмента, специфічного щодо антигена клітини-мішені, може підвищувати інтерналізацію антигена клітини-мішені, знижуючи тим самим його доступність.

Однак у багатьох інших випадках доцільним є одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, яка містить два або більшу кількість антигензв'язувальних фрагментів (таких як молекули Fab), специфічних щодо антигена клітини-мішені (див. приклади, представлені на фіг. 1B, 1B, 1Г, 1Д, 1Ж, 13, 1І або 1Й), наприклад, для оптимізації спрямованого перенесення до сайту-мішені або для забезпечення перехресного

зшивання антигенів клітини-мішені.

Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, додатково містить третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном. Перший антиген переважно являє собою антиген клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab. В одному з варіантів здійснення винаходу третя молекула Fab ідентична першій молекулі Fab (тобто перша і третя молекули Fab містять однакові амінокислотні послідовності важкого і легкого ланцюгів і однакове розташування доменів (тобто канонічне або кросовер)). В конкретному варіанті здійснення винаходу друга молекула Fab специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, насамперед CD3, а перша і третя молекули Fab специфічно зв'язуються з антигеном клітини-мішені.

В альтернативних варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, додатково містить третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном. В цих варіантах здійснення винаходу другий антиген переважно являє собою антиген клітини-мішені. В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab (молекулу Fab, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного). В одному з варіантів здійснення винаходу третя молекула Fab ідентична другій молекулі Fab (тобто друга і третя молекули Fab містять однакові амінокислотні послідовності важкого і легкого ланцюгів і однакове розташування доменів (тобто канонічне або кросовер)). В одному з таких варіантів здійснення винаходу перша молекула Fab специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, насамперед CD3, а друга і третя молекули Fab специфічно зв'язуються з антигеном клітини-мішені.

В одному з варіантів здійснення винаходу третя молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої або другої субодиниці Fc-домену.

В конкретному варіанті здійснення винаходу друга і третя молекули Fab кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць F-домену, а перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої, другої і третьої молекули Fab, Fc-домену, що складається з першої і другої субодиниць, і необов'язково з одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, а друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої субодиниці Fc-домену і в якій третя молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем другої субодиниці Fc-домену. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1Б і 1Г (конкретні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab і переважно ідентична першій молекулі Fab) і на фіг. 1Ж і 1І (альтернативні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab і переважно ідентична другій молекулі Fab). Друга і третя молекули Fab можуть бути злиті з Fc-доменом безпосередньо або через пептидний лінкер. В конкретному варіанті здійснення винаходу друга і третя молекули Fab кожна злита з Fc-доменом через шарнірну область імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу шарнірна область імуноглобуліну являє собою шарнірну область людського IgG₁, насамперед, коли Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁. Необов'язково легкий ланцюг першої молекули Fab і легкий ланцюг другої молекули Fab додатково можуть бути злиті один з одним.

В альтернативному варіанті здійснення винаходу перша і третя молекули Fab кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї з субодиниць Fc-домену, друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої, другої і третьої молекули Fab, Fc-домену, що складається з першої і другої субодиниць, і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, а перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем першої субодиниці Fc-домену, і в якій третя молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем другої субодиниці Fc-домену. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1В і 1Д (конкретні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab і переважно ідентична першій молекулі Fab) і на фіг. 1З і 1І (альтернативні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab і переважно ідентична другій молекулі Fab). Перша і третя молекули Fab можуть бути злиті з Fc-доменом безпосередньо або через пептидний лінкер. В

конкретному варіанті здійснення винаходу перша і третя молекули Fab кожна злита з Fc-доменом через шарнірну область імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу шарнірна область імуноглобуліну являє собою шарнірну область людського IgG₁, насамперед, коли Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁. Необов'язково легкий ланцюг першої молекули Fab і

5 легкий ланцюг другої молекули Fab додатково можуть бути злиті один з одним.

В конфігураціях, в яких біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, в якій молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем кожної з субодиниць Fc-домену через шарнірні області імуноглобуліну, дві молекули Fab, шарнірні області і Fc-домен практично утворюють молекулу імуноглобуліну. В конкретному варіанті здійснення винаходу

10 молекула імуноглобуліну являє собою імуноглобулін класу IgG. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін підкласу IgG₁. В іншому варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою імуноглобулін підкласу IgG₄. В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу імуноглобулін являє собою людський імуноглобулін. В інших варіантах здійснення винаходу імуноглобулін являє собою химерний імуноглобулін або

15 гуманізований імуноглобулін.

В деяких варіантах біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, легкий ланцюг Fab першої молекули Fab і легкий ланцюг Fab другої молекули Fab злиті один з одним необов'язково через пептидний лінкер. Залежно від конфігурації першої і другої молекули Fab легкий ланцюг Fab першої молекули Fab може бути

20 злитий на його С-кінці з N-кінцем легкого ланцюга Fab другої молекули Fab, або легкий ланцюг Fab другої молекули Fab може бути злитий на його С-кінці з N-кінцем легкого ланцюга Fab першої молекули Fab. Злиття легких ланцюгів Fab першої і другої молекули Fab додатково знижує помилкове спарювання невідповідних важких і легких ланцюгів Fab, а також знижує кількість плазмід, необхідних для експресії деяких їх біспецифічних антигензв'язувальних

25 молекул, які активують Т-клітини, пропонуваних у винаході.

В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить поліпептид, у якому варіабельна область легкого ланцюга другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab (тобто друга молекула Fab містить важкий ланцюг кросовер-

30 молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга замінена варіабельною областю легкого ланцюга), яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиницею Fc-домену (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)), і поліпептид, в якому важкий ланцюг Fab першої молекули Fab об'єднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиницею Fc-домену (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить також поліпептид, у якому

35 варіабельна область важкого ланцюга Fab другої молекули об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю легкого ланцюга Fab другої молекули Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎), і поліпептид легкого ланцюга Fab першої молекули Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). В деяких варіантах здійснення винаходу поліпептиди ковалентно зв'язані, наприклад, за допомогою дісульфідного

40 містка.

В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить поліпептид, у якому варіабельна область легкого ланцюга Fab другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab (тобто друга молекула Fab містить важкий ланцюг кросовер-

45 молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга замінена на варіабельну область легкого ланцюга), яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з важким ланцюгом Fab першої молекули Fab, яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиницею Fc-домену (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎-CH2-CH3(-CH4)). В інших варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини,

50 містить поліпептид, в якому важкий ланцюг Fab першої молекули Fab об'єднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною областю легкого ланцюга Fab другої молекули Fab, яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab (тобто друга молекула Fab містить важкий ланцюг кросовер-молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга замінена на

55 варіабельну область легкого ланцюга), яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиницею Fc-домену (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-CH2-CH3(-CH4)).

В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить також поліпептид легкого ланцюга кросовер-молекули Fab другої молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю легкого ланцюга Fab

60

другої молекули Fab ($VH_{(2)}-CL_{(2)}$), поліпептид легкого ланцюга першої молекули Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}$). В інших зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить також поліпептид, у якому варіабельна область легкого ланцюга Fab другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з поліпептидом легкого ланцюга Fab першої молекули Fab ($VL_{(2)}-CH1_{(2)}-VL_{(1)}-CL_{(1)}$), або поліпептид, в якому поліпептид легкого ланцюга Fab першої молекули Fab об'єднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю легкого ланцюга Fab другої молекули Fab ($VL_{(1)}-CL_{(1)}-VH_{(2)}-CL_{(2)}$), якщо це можливо.

Відповідно до цих варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, може містити також (I) поліпептид субодиниці Fc-домену ($CH2-CH3(-CH4)$), або (II) поліпептид важкого ланцюга Fab третьої молекули Fab, який об'єднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з субодиницею Fc-домену ($VH_{(3)}-CH1_{(3)}-CH2-CH3(-CH4)$), і поліпептид легкого ланцюга Fab третьої молекули Fab ($VL_{(3)}-CL_{(3)}$). В деяких варіантах здійснення винаходу поліпептиди ковалентно зв'язані, наприклад, за допомогою дисульфідного містка.

В деяких варіантах здійснення винаходу перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини не містить Fc-домен. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої і другої молекули Fab і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1K і 1O.

В інших варіантах здійснення винаходу друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, не містить Fc-домен. В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої і другої молекули Fab і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1Л і 1П.

В деяких варіантах здійснення винаходу перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, і біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, додатково містить третю молекулу Fab, злику на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В зазначених конкретних варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab. В інших зазначених варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного. В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої, другої і третьої молекули Fab і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, а третя молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1C і 1P (конкретні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab і переважно ідентична першій молекулі Fab).

В деяких варіантах здійснення винаходу перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, і біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, додатково містить третю молекулу Fab, в якій зазначена третя молекула Fab злита на N-кінці важкого ланцюга Fab з С-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. В конкретних зазначених варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного. В інших зазначених варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab. В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини,

практично складається з першої, другої і третьої молекули Fab і необов'язково одного або декількох пептидних лінкерів, в якій перша молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, а третя молекула Fab злита на N-кінці важкого ланцюга Fab з С-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. Зазначена

5 конфігурація схематично зображено на фіг. 1С і 1Ф (конкретні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab і переважно ідентична другий молекулі Fab).

В деяких варіантах здійснення винаходу друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, і біспецифічна

10 антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, додатково містить третю молекулу Fab, в якій зазначена третя молекула Fab злита на N-кінці важкого ланцюга Fab з С-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. В конкретних зазначених варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab. В інших зазначених

15 варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного. В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої, другої і третьої молекули Fab і необов'язково одного або

20 декількох пептидних лінкерів, в якій друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, а третя молекула Fab злита на N-кінці важкого ланцюга Fab з С-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1Н і 1С (конкретні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab і переважно ідентична першій молекулі Fab).

В деяких варіантах здійснення винаходу друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, і біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, додатково містить третю молекулу Fab, в якій зазначена третя молекула Fab злита на М-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. В конкретних зазначених варіантах здійснення винаходу

30 зазначена третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного. В інших зазначених варіантах здійснення винаходу зазначена третя молекула Fab являє собою канонічну молекулу Fab. В деяких зазначених варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, практично складається з першої, другої і третьої молекули Fab і необов'язково одного або

35 декількох пептидних лінкерів, в якій друга молекула Fab злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, а третя молекула Fab злита на М-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab. Зазначена конфігурація схематично зображено на фіг. 1У і 1Х (конкретні варіанти здійснення винаходу, в яких третя молекула Fab являє собою кросовер-молекулу Fab і переважно ідентична першій молекулі Fab).

В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить поліпептид, в якому важкий ланцюг першої молекули Fab об'єднаний карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною областю другої молекули Fab, яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab (тобто друга молекула Fab містить важкий ланцюг кросовер-молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга замінена варіабельною областю легкого ланцюга) (VH₍₁₎-CH1₍₁₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎). В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить також поліпептид, у якому

50 варіабельна область важкого ланцюга Fab другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю легкого ланцюга Fab другої молекули Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎), і поліпептид легкого ланцюга Fab першої молекули Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎).

В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, містить поліпептид, у якому варіабельна область легкого ланцюга Fab другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю Fab другої молекули Fab (тобто друга молекула Fab містить важкий ланцюг кросовер-молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга замінена варіабельною областю легкого ланцюга), яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з важким ланцюгом Fab першої молекули Fab (VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). В

60 деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує

замінена варіабельною областю легкого ланцюга), яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з варіабельною областю легкого ланцюга Fab другої молекули Fab, яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю важкого ланцюга Fab другої молекули Fab (тобто друга молекула Fab містить важкий ланцюг кросовер-молекули Fab, в якій варіабельна область важкого ланцюга замінена варіабельною областю легкого ланцюга), яка в свою чергу об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з важким ланцюгом Fab першої молекули Fab (VL₍₃₎-CH1₍₃₎-VL₍₂₎-CH1₍₂₎-VH₍₁₎-CH1₍₁₎). В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить також поліпептид, у якому варіабельна область важкого ланцюга Fab другої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю легкого ланцюга Fab другої молекули Fab (VH₍₂₎-CL₍₂₎), і поліпептид легкого ланцюга Fab першої молекули Fab (VL₍₁₎-CL₍₁₎). В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить також поліпептид, у якому варіабельна область важкого ланцюга Fab третьої молекули Fab об'єднана карбоксикінцевим пептидним зв'язком з константною областю легкого ланцюга Fab третьої молекули Fab (VH₍₃₎-CL₍₃₎).

Відповідно до будь-якого з наведених вище варіантів здійснення винаходу компоненти біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини (наприклад, молекули Fab, Fc-домен) можуть бути злиті безпосередньо або через різні лінкери, зокрема, пептидні лінкери, які містять одну або декілька амінокислот, як правило, приблизно 2-20 амінокислот, які представлені в даному описі або відомі в даній галузі. Прийнятні неімуногенні пептидні лінкери включають, наприклад, пептидні лінкери (G₄S)_n, (SG₄)_n, (G₄S)_n або G₄(SG₄)_n, в яких n звичайно позначає число від 1 до 10, як правило, від 2 до 4.

Fc-домен

Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, складається з пари поліпептидних ланцюгів, які містять домени важкого ланцюга молекули імуноглобуліну. Наприклад, Fc-домен молекули імуноглобуліну G (IgG) являє собою димер, кожна з субодиниць якого містить константні домени CH2 і CH3 важкого ланцюга IgG. Дві субодиниці Fc-домену мають здатність до стабільної асоціації одна з одною. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонується у винаході, містить не більше одного Fc-домену.

В одному з варіантів здійснення Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, являє собою Fc-домен IgG. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁. В іншому варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₄. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₄, який містить амінокислотну заміну в положенні S228 (нумерація за Кеботом), насамперед амінокислотну заміну S228P. Ця амінокислотна заміна знижує обмін *in vivo* в Fab-плечі антитілу у вигляді IgG₄ (див. Stubenrauch і ін., Drug Metabolism and Disposition 38, 2010, сс. 84-91). В іншому конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен є людським. Наведена як приклад послідовність Fc-області людського IgG₁ представлена в SEQ ID NO: 13.

Модифікації Fc-домену, що посилюють гетеродимеризацію

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонується у винаході, містять різні молекули Fab, злиті з однією або з іншою з двох субодиниць Fc-домену, при цьому дві субодиниці Fc-домену, як правило, містяться у двох неідентичних поліпептидних ланцюгах. Рекombінантна спільна експресія цих поліпептидів і наступна димеризація приводить до декількох можливих комбінацій двох поліпептидів. Для підвищення виходу і чистоти біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, при їх одержанні методами рекомбінації доцільно інтродукувати в Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, модифікацію, яка посилює асоціацію необхідних поліпептидів.

Таким чином, в конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонується у винаході, містить модифікацію, яка посилює асоціацію першої і другої субодиниць Fc-домену. Сайт найбільш сильної білок-білкової взаємодії двох субодиниць Fc-домену людського IgG знаходиться в CH3-домени Fc-домену. Таким чином, в одному з варіантів здійснення винаходу зазначена модифікація знаходиться в CH3-домени Fc-домену.

Відомо декілька підходів до модифікацій в CH3-домени Fc-домену для посилення гетеродимеризації, які докладно описані, наприклад, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291. Як правило, при здійсненні всіх зазначених підходів CH3-домен першої субодиниці Fc-домену і CH3-домен другої субодиниці Fc-домену обидва конструюють комплементарним чином так, щоби кожний

СНЗ-домен (або важкий ланцюг, який його містить) не мав більше здатності до гомодимеризації сам з собою, але мав посилену здатність до гетеродимеризації з комплементарним сконструйованим іншим СНЗ-доменом (тобто має місце гетеродимеризація першого і іншого СНЗ-домену і не утворюються гомодимери між двома першими або двома другими СНЗ-доменами). Зазначені різні підходи до підвищення гетеродимеризації розглядаються як різні альтернативи в поєднанні з модифікаціями важких-легких ланцюгів (обмін/заміна VH і VL в одному зв'язувальному плечі і інтродукція заміни заряджених амінокислот з протилежними зарядами в поверхні поділу СН1/СL) в біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, що знижує помилкове спарювання і утворення побічних продуктів в результаті взаємодії бенс-джонсовського типу.

В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена модифікація, яка стимулює асоціацію першої і другої субодиниць Fc-домену, являє собою, так названу модифікацію типу "knob-in-hole" (типу "виступ-западина"), яка включає модифікацію, що приводить до утворення "виступу" в одній з двох субодиниць Fc-домену і до утворення "западини" в іншій одній з двох субодиниць Fc-домену.

Технологія "knob-into-hole" описана, наприклад, в US № 5731168; US № 7695936; у Ridgway і ін., Prot Eng 9, 1996, сс. 617-621 і Carter, J Immunol Meth 248, 2001, сс. 7-15. У цілому, метод включає інтродукцію опуклості ("виступ") на поверхні розділу першого поліпептиду і відповідної порожнини ("западина") в поверхні поділу іншого поліпептиду, в результаті опуклості може поміщатися в порожнину, посилюючи тим самим утворення гетеродимеру і перешкоджаючи утворенню гомодимеру. Опуклості конструюють шляхом заміни амінокислот з невеликими бічними ланцюгами на поверхні розділу першого поліпептиду на амінокислоти з більш великими бічними ланцюгами (наприклад, на тирозин або триптофан). Компенсуючі порожнини ідентичного або подібного з опуклостями розміру конструюють в поверхні поділу іншого поліпептиду шляхом заміни амінокислот з великими бічними ланцюгами на амінокислоти з менш великими бічними ланцюгами (наприклад, аланін або треонін).

Таким чином, в конкретному варіанті здійснення винаходу в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, який має більший об'єм бічного ланцюга, що приводить до утворення опуклості в СНЗ-домені першої субодиниці, яка може поміщатися в порожнину в СНЗ-домені другої субодиниці, і в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, який має менший об'єм бічного ланцюга, що приводить до утворення порожнини в СНЗ-домені другої субодиниці, в яку може поміщатися опуклості в СНЗ-домені першої субодиниці.

Переважаю зазначений амінокислотний залишок, який має більший за об'ємом бічний ланцюг, вибирають з групи, що включає аргінін (R), фенілаланін (F), тирозин (Y) і триптофан (W).

Переважаю амінокислотний залишок, який має менший за об'ємом бічний ланцюг, вибирають з групи, що включає аланін (A), серин (S), треонін (T) і валін (V).

Опуклості і порожнину можна створювати шляхом зміни нуклеїнових кислот, що кодують поліпептиди, наприклад, за допомогою сайтспрямованого мутагенезу або шляхом пептидного синтезу.

В конкретному варіанті здійснення винаходу в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену (субодиниця з "виступами") залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком триптофану (T366W), а в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену (субодиниця з "западиною") залишок тирозину в положенні 407 замінений на залишок валіну (Y407V). В одному з варіантів здійснення винаходу в другій субодиниці Fc-домену додатково залишок треоніну в положенні 366 замінений на залишок серину (T366S) і залишок лейцину в положенні 368 замінений на залишок аланіну (L368A) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В наступному варіанті здійснення винаходу в першій субодиниці Fc-домену додатково залишок серину в положенні 354 замінений на залишок цистеїну (S354C) або залишок глутамінової кислоти в положенні 356 замінений на залишок цистеїну (E356C), а в другій субодиниці Fc-домену додатково залишок тирозину в положенні 349 замінений на залишок цистеїну (Y349C) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). Інтродукція зазначених двох залишків цистеїну приводить до утворення дисульфідного містка між двома субодиницями Fc-домену, додатково стабілізуючи димер (Carter, J Immunol Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В конкретному варіанті здійснення винаходу перша субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни S354C і T366W, а друга субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни Y349C, T366S, L368A і Y407V (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В конкретному варіанті здійснення винаходу молекула Fab, яка специфічно зв'язується з

антигеном, який активує Т-клітини, злита (необов'язково через молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені) з першою субодиницею Fc-домену (яка містить модифікацію, що приводить до утворення "виступу"). Не вдаючись до будь-якої теорії, злиття молекули Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, з субодиницею Fc-домену, що містить "виступ", повинно (додатково) мінімізувати утворення антигензв'язувальних молекул, які містять дві молекули Fab, які мають здатність зв'язуватися з антигеном, який активує Т-клітини (стеричне "зіткнення" двох поліпептидів, які містять "виступ").

Інші методи СНЗ-модифікації для посилення гетеродимеризації розглядаються в даному винаході як альтернативи, і вони описані, наприклад, в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291.

В одному з варіантів здійснення винаходу як альтернативу можна використовувати підхід до гетеродимеризації, описаний в EP 1870459A1. Цей підхід базується на інтродукції заміну/мутації заряджених амінокислот на амінокислоти з протилежним зарядом в конкретні амінокислотні положення в поверхні поділу СНЗ/СНЗ-доменів між двома важкими ланцюгами. В одному варіанті кращими для біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, запропонованої у винаході, є амінокислотні мутації R409D; K370E в одному з двох СНЗ-доменів (Fc-домену) і амінокислотні мутації D399K; E357K в іншому одному з СНЗ-доменів Fc-домену (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В іншому варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, запропонована у винаході, містить амінокислотну мутацію T366W в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену і амінокислотні мутації T366S, L368A, Y407V в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену і додатково амінокислотні мутації R409D; K370E в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену і амінокислотні мутації D399K; E357K в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В іншому варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, запропонована у винаході, містить амінокислотні мутації S354C, T366W в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену і амінокислотні мутації Y349C, T366S, L368A, Y407V в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену, або зазначена біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить амінокислотні мутації Y349C, T366W в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену і амінокислотні мутації S354C, T366S, L368A, Y407V в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену і додатково амінокислотні мутації R409D; K370E в СНЗ-домені першої субодиниці Fc-домену і амінокислотні мутації D399K; E357K в СНЗ-домені другої субодиниці Fc-домену (у всіх випадках нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу як альтернативу використовують підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2013/157953. В одному з варіантів здійснення винаходу перший СНЗ-домен містить амінокислотну мутацію T366K, а другий СНЗ-домен містить амінокислотну мутацію L351D (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота). В іншому варіанті здійснення винаходу перший СНЗ-домен містить також амінокислотну мутацію L351K. В наступному варіанті здійснення винаходу другий СНЗ-домен містить також амінокислотну мутацію, вибрану з Y349E, Y349D і L368E (переважно L368E) (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу як альтернативу використовують підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2012/058768. В одному з варіантів здійснення перший СНЗ-домен містить амінокислотні мутації L351Y, Y407A, а другий СНЗ-домен містить амінокислотні мутації T366A, K409F. В іншому варіанті здійснення винаходу другий СНЗ-домен містить також амінокислотну мутацію в положенні T411, D399, S400, F405, N390 або K392, наприклад, вибрану з а) T411N, T411R, T411Q, T411K, T411D, T411E або T411W, б) D399R, D399W, D399Y або D399K, в) S400E, S400D, S400R або S400K, г) F405I, F405M, F405T, F405S, F405V або F405W, ґ) N390R, N390K або N390D, д) K392V, K392M, K392R, K392L, K392F або K392E (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В наступному варіанті здійснення винаходу перший СНЗ-домен містить амінокислотні мутації L351Y, Y407A, а другий СНЗ-домен містить амінокислотні мутації T366V, K409F. В іншому варіанті здійснення винаходу перший СНЗ-домен містить амінокислотну мутацію Y407A, а другий СНЗ-домен містить амінокислотні мутації T366A, K409F. В наступному варіанті здійснення винаходу другий СНЗ-домен додатково містить амінокислотні мутації K392E, T411E, D399R і S400R (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу як альтернативу використовують підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2011/143545, наприклад, з модифікацією амінокислоти в положенні, вибраному з групи, що включає 368 і 409 (нумерація відповідно до EU-індексу

Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу як альтернативу використовують підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2011/090762, в якому також застосовують описану вище технологію "knobs-into-holes". В одному з варіантів здійснення винаходу перший СН3-домен містить амінокислотну мутацію Т366W, а другий СН3-домен містить амінокислотну мутацію Y407A. В одному з варіантів здійснення винаходу перший СН3-домен містить амінокислотну мутацію Т366Y, а другий СН3-домен містить амінокислотну мутацію Y407T (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, або її F-домен відноситься до IgG₂-підкласу і як альтернативу використовують підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2010/129304.

В альтернативному варіанті здійснення винаходу модифікація, яка підсилює асоціацію першої і другої субодиниць Fc-домену, являє собою модифікацію, що опосередковує впливи, які визначаються електростатичною дією, наприклад, описані в публікації PCT WO 2009/089004. У цілому, зазначений метод включає заміну одного або декількох амінокислотних залишків на поверхні розділу двох субодиниць Fc-домену на заряджені амінокислотні залишки, в результаті чого утворення гомодимеру стає електростатично не вигідним, а гетеродимеризація стає електростатично вигідною. В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу перший СН3-домен містить амінокислотну заміну K392 або N392 на негативно заряджену амінокислоту (наприклад, глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D), переважно K392D або N392D), а другий СН3-домен містить амінокислотну заміну D399, E356, D356 або E357 на позитивно заряджену амінокислоту (наприклад, лізин (K) або аргінін (R), переважно D399K, E356K, D356K або E357K, і більш переважно D399K або E356K). В іншому варіанті здійснення винаходу перший СН3-домен містить також амінокислотну заміну K409 або R409 на негативно заряджену амінокислоту (наприклад, глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D), переважно K409D або R409D). В наступному варіанті здійснення винаходу перший СН3-домен у додатковому або альтернативному варіанті містить амінокислотну заміну K439 і/або K370 на негативно заряджену амінокислоту (наприклад, глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D)) (всі нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

Ще у одному варіанті здійснення винаходу як альтернативу використовують підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2007/147901. В одному з варіантів здійснення винаходу перший СН3-домен містить амінокислотні мутації K253E, D282K і K322D, а другий СН3-домен містить амінокислотні мутації D239K, E240K і K292D (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

Ще у одному варіанті здійснення винаходу як альтернативу можна використовувати підхід до гетеродимеризації, описаний в WO 2007/110205.

В одному з варіантів здійснення винаходу перша субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни K392D і K409D, а друга субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни D356K і D399K (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).

Модифікації Fc-домену, які приводять до зниження зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторної функції

Fc-домен надає біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, яка активує Т-клітини, кращі фармакокінетичні властивості, включаючи тривалий час напівжиття в сироватці, що забезпечує хороше накопичення в тканині-мішені і бажане співвідношення розподілення в тканині-крові. Однак у той же час він може приводити до небажаної спрямованості біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, до клітин, які експресують Fc-рецептори, а не до переважних клітин, що несуть антиген. Крім того, спільна активація шляхів передачі сигналів Fc-рецептора може приводити до вивільнення цитокінів, що в поєднанні з активуючими Т-клітини властивостями і тривалим часом напівжиття антигензв'язувальної молекули, приводить до надлишкової активації цитокінових рецепторів і серйозних побічних дій при системному введенні. Активація імунних клітин (що несуть Fc-рецептор), відмінних від Т-клітин, може навіть знижувати ефективність біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, через можливу деструкцію Т-клітин, наприклад, NK-клітинами.

Таким чином, відповідно до конкретних варіантів здійснення винаходу Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, має знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або знижену ефекторну функцію у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG₁. В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, та містить зазначений Fc-домен) характеризується афінністю зв'язування, що становить менше ніж 50 %, переважно менше ніж 20 %, більш переважно менше ніж 10 % і найбільш переважно менше ніж

5 % від афінності зв'язування з Fc-рецептором нативного Fc-домену IgG₁ (або біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить зазначений нативний Fc-домен IgG₁), і/або ефекторною функцією, що становить менше ніж 50 %, переважно менше ніж 20 %, більш переважно менше ніж 10 % і найбільш переважно менше ніж 5 % від ефекторної функції нативного Fc-домену IgG₁ (або біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить зазначений нативний Fc-домен IgG₁). В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, та містить зазначений Fc-домен) практично не зв'язується з Fc-рецептором і/або не індукує ефекторну функцію. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активуючий Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активуючий людський Fcγ-рецептор, більш конкретно людський FcγRIIIa, FcγRI або FcγRIIa, найбільш переважно людський FcγRIIIa. В одному з варіантів здійснення винаходу ефекторна функція являє собою одну або декілька функцій, вибраних з групи, що включає CDC, ADCC, ADCP і секрецію цитокінів. В конкретному варіанті здійснення винаходу ефекторна функція являє собою ADCC. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен характеризується практично такою ж афінністю зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), що і нативний Fc-домен IgG₁. Практично таке ж зв'язування з FcRn досягається, коли Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить зазначений Fc-домен), характеризується афінністю зв'язування, що становить більше ніж приблизно 70 %, переважно більше ніж приблизно 80 %, більш переважно більше ніж приблизно 90 %, від афінності зв'язування нативного Fc-домену IgG₁ (або біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить нативний Fc домен IgG₁) з FcRn.

Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу Fc-домен конструюють так, щоби він мав знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором і/або знижену ефекторну функцію у порівнянні з не підданим інженерії Fc-доменом. В конкретних варіантах здійснення винаходу Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, містить одну або декілька амінокислотних мутацій, які знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію. Як правило, в кожній з двох субодиниць Fc-домену присутня(і) одна або декілька однакових амінокислотних мутацій. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені амінокислотні мутації знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором принаймні в 2 рази, принаймні в 5 разів або принаймні в 10 разів. Відповідно до варіантів здійснення винаходу, в яких має місце більше однієї амінокислотної мутації, які знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором, комбінація зазначених амінокислотних мутацій може знижувати афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором принаймні в 10 разів, принаймні в 20 разів або принаймні в 50 разів. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить сконструйований Fc-домен, характеризується афінністю зв'язування, що становить менше ніж 20 %, зокрема, менше ніж 10 %, більш переважно менше ніж 5 % від афінності зв'язування з Fc-рецептором, характерної для біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить не підданий інженерії Fc-домен. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активуючий Fc-рецептор. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-рецептор являє собою активуючий людський Fc-рецептор, більш конкретно людський FcγRIIIa, FcγRI або FcγRIIa, найбільш переважно людський FcγRIIIa. Переважно зменшується зв'язування з кожним з цих рецепторів. Відповідно до деяких варіантів здійснення винаходу знижується також афінність зв'язування з компонентом системи комплементу, зокрема, афінність зв'язування з C1q. Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу не знижується афінність зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn). Практично таке ж зв'язування з FcRn, тобто збереження афінності зв'язування Fc-домену з зазначеним рецептором, досягається, коли Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, яка містить зазначений Fc-домен) характеризується афінністю зв'язування з FcRn, що становить більше ніж приблизно 70 % від афінності зв'язування з FcRn не підданої інженерії форми Fc-домену (або біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить не піддану інженерії форму Fc-домену). Fc-домен або біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, які містять зазначений Fc-домен, можуть характеризуватися афінністю, що становить більше ніж приблизно 80 % і навіть більше ніж приблизно 90 % від зазначеної вище афінності. В деяких

варіантах здійснення винаходу Fc-домен біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, створюють так, щоби він мав знижену ефекторну функцію у порівнянні з не підданим інженерії Fc-доменом. Знижена ефекторна функція може являти собою (але, не обмежуючись тільки ними) знижену(і) одну або декілька з наступних функцій: знижена комплементзалежна цитотоксичність (CDC), знижена антитіло-обумовлена клітиннозалежна цитотоксичність (ADCC), знижений антитіло-обумовлений клітиннозалежний фагоцитоз (ADCP), знижена секреція цитокінів, знижене опосередковане імунним комплексом поглинання антигена антигенпрезентуючими клітинами, знижене зв'язування з NK-клітинами, знижене зв'язування з макрофагами, знижене зв'язування з моноцитами, знижене зв'язування з поліморфоядерними клітинами, знижена безпосередня передача сигналу, що індукує апоптоз, знижене перехресне зшивання зв'язаних з мішенню антитіл, знижене дозрівання дендритних клітин або знижене Т-клітинне примування. В одному з варіантів здійснення винаходу знижена ефекторна функція являє собою одну або декілька функцій, вибраних з групи, що включає знижену CDC, знижену ADCC, знижений ADCP і знижену секрецію цитокінів. В конкретному варіанті здійснення винаходу знижена ефекторна функція являє собою знижену ADCC. В одному з варіантів здійснення винаходу знижена ADCC становить менше 20 % від ADCC, індукованої не підданим інженерії Fc-доменом (або біспецифічною антигензв'язувальною молекулою, яка активує Т-клітини та яка містить не підданий інженерії Fc-домен).

В одному з варіантів здійснення винаходу амінокислотна мутація, яка знижує афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, являє собою амінокислотну заміну. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні, вибраному з E233, L234, L235, N297, P331 і P329 (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В більш конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні, вибраному з L234, L235 і P329 (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотні заміни L234A і L235A (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁, зокрема, Fc-домен людського IgG₁. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні P329. В більш конкретному варіанті здійснення винаходу амінокислотна заміна являє собою P329A або P329G, насамперед P329G (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні P329 і, крім того, амінокислотну заміну в положенні, вибраному з E233, L234, L235, N297 і P331 (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В більш конкретному варіанті здійснення винаходу додаткова амінокислотна заміна являє собою E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D або P331S. В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотні заміни в положеннях P329, L234 і L235 (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В більш конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("P329G LALA"). В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен являє собою Fc-домен IgG₁, насамперед Fc-домен людського IgG₁. Комбінація амінокислотних замін "P329G LALA" практично повністю елімінує зв'язування з Fcγ-рецептором (а також з комплементом) Fc-домену людського IgG₁, що описано в публікації PCT WO 2012/130831, яка повністю включена у даний опис як посилання. В WO 2012/130831 описані також методи одержання зазначених мутантних Fc-доменів, методи вивчення їх властивостей, таких як зв'язування з Fc-рецептором або ефекторні функції.

Антитіла підкласу IgG₄ мають знижену афінність до зв'язування з Fc-рецепторами і зниженими ефекторними функціями у порівнянні з антитілами підкласу IgG₁. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропорованих у винаході, являє собою Fc-домен IgG₄, зокрема Fc-домен людського IgG₄. В одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен IgG₄ містить амінокислотні заміни в положенні S228, конкретно амінокислотну заміну S228P (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). Для додаткового зниження афінності зв'язування з Fc-рецептором і/або його ефекторної функції в одному з варіантів здійснення винаходу Fc-домен IgG₄ містить амінокислотну заміну в положенні L235, зокрема, амінокислотну заміну L235E (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В іншому варіанті здійснення винаходу Fc-домен IgG₄ містить амінокислотну заміну в положенні P329, зокрема, амінокислотну заміну P329G (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен IgG₄ містить амінокислотні заміни в положеннях S228, L235 і P329, зокрема, амінокислотні заміни S228P, L235E і P329G (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). Зазначені мутанти Fc-домену IgG₄ і їх особливості зв'язування з Fcγ-рецептором описані в публікації PCT WO 2012/130831 PCT/EP2012/055393, яка повністю включена у даний опис як

посилання.

В конкретному варіанті здійснення винаходу Fc-домен, що характеризується зниженою афінністю зв'язування з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG₁, являє собою Fc-домен людського IgG₁, який містить амінокислотні заміни L234A, L235A і необов'язково P329G, або Fc-домен людського IgG₄, який містить амінокислотні заміни S228P, L235E і необов'язково P329G (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

В деяких варіантах здійснення винаходу елімінували N-глікозилювання Fc-домену. В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу Fc-домен містить амінокислотну мутацію в положенні N297, зокрема, амінокислотну заміну аспарагіну на аланін (N297A) або аспарагінову кислоту (N297D) (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота).

Окрім Fc-доменів, описаних вище і в публікації PCT WO 2012/130831, Fc-домени зі зниженою здатністю зв'язуватися з Fc-рецептором і/або ефекторною функцією включають також Fc-домени з заміною одного або декількох залишків 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (US № 637056) (нумерації відповідно до EU-індексу Кебота). До зазначених мутантів Fc відносяться мутанти Fc з замінами в двох або більшій кількості з амінокислотних положень 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так називаний мутант Fc-домену "DANA" з заміною залишків 265 і 297 на аланін (US № 7332581).

Мутантні Fc-домени можна одержувати шляхом амінокислотної делеції, заміни, інсерції або модифікації з використанням генетичних або хімічних методів, добре відомих в даній галузі. Генетичні методи можуть включати сайтспрямований мутагенез кодууючої ДНК послідовності, ПЛР, синтез генів і т.п. Правильність нуклеотидних замін можна підтверджувати, наприклад, секвенуванням.

Зв'язування з Fc-рецепторами можна легко визначати, наприклад, за допомогою ELISA або поверхневого плазмонного резонансу (SPR) з використанням стандартного устаткування, такого як пристрій BIACore (фірма GE Healthcare), і із застосуванням таких Fc-рецепторів, які можна одержувати методом рекомбінантної експресії. Прийнятний зазначений аналіз зв'язування представлений в даному описі. Альтернативно цьому, афінність зв'язування Fc-доменів або біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують клітини та які містять Fc-домен, з Fc-рецепторами можна оцінювати з використанням клітинних ліній, для яких відомо, що вони експресують конкретні Fc-рецептори, таких як людські NK-клітини, експресуючі FcγIIIa-рецептор.

Ефекторну функцію Fc-домену або біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить Fc-домен, можна оцінювати методами, відомими в даній галузі. Прийнятний аналіз для оцінювання ADCC представлений в даному описі. Інші приклади аналізів *in vitro*, призначених для оцінювання ADCC-активності молекули, що являє інтерес, описані в US № 5500362; у Hellstrom і ін., Proc Natl Acad Sci USA 83, 1986, сс. 7059-7063 і Hellstrom і ін., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1985, сс. 1499-1502; US № 5821337; у Bruggemann і ін., J Exp Med 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно цьому, можна застосовувати методи, основані на нерадіоактивному аналізі (див., наприклад, ACT™ - нерадіоактивний аналіз цитотоксичності за допомогою протокової цитометрії (фірма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Каліфорнія); і CytoTox 96® - нерадіоактивний аналіз цитотоксичності (фірма Promega, Медісон, шт. Вісконсин)). Прийнятними ефекторними клітинами для таких аналізів є моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і природні клітини-кілери (NK). В альтернативному або додатковому варіанті ADCC-активність молекули, що являє інтерес, можна оцінювати *in vivo*, наприклад, з використанням створених на тваринах моделей, описаних у Clynes і ін., Proc Natl Acad Sci USA 95, 1998, сс. 652-656.

В деяких варіантах здійснення винаходу знижують зв'язування Fc-домену з компонентом системи комплементу, зокрема з C1q. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу, в яких Fc-домен конструюють так, щоби він мав знижену ефекторну функцію, зазначена знижена ефекторна функція включає знижену CDC. Можна здійснювати аналізи зв'язування C1q для вирішення питання про те, чи може біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, зв'язуватися з C1q і, як наслідок, чи має вона CDC-активність (див., наприклад, аналізи зв'язування з C1q і C3c за допомогою ELISA, описані в WO 2006/029879 і WO 2005/100402). Для оцінювання активації комплементу можна здійснювати аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro і ін., J Immunol Methods 202, 1996, с. 163; Cragg і ін., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 і Cragg і Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

Антигензв'язувальні фрагменти

Антигензв'язувальна молекула, пропонована у винаході, є біспецифічною, тобто вона містить принаймні два антигензв'язувальних фрагменти, які мають здатність специфічно зв'язуватися з двома різними антигенними детермінантами. Відповідно до винаходу

антигензв'язувальні фрагменти являють собою молекули Fab (тобто антигензв'язувальні домени, які складаються з важкого і легкого ланцюга, кожний з яких містить варіабельний і константний домен). В одному з варіантів здійснення винаходу зазначені молекули Fab є людськими. В іншому варіанті здійснення винаходу зазначені молекули Fab є гуманізованими. В наступному варіанті здійснення винаходу зазначені молекули Fab містять константні домени людського важкого і легкого ланцюга.

Принаймні один з антигензв'язувальних фрагментів являє собою кросовер-молекулу Fab. Зазначені модифікації перешкоджають помилковому спарюванню важких і легких ланцюгів з різних молекул Fab, підвищуючи тим самим вихід і чистоту біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, при рекомбінантному одержанні. В конкретній кросовер-молекулі Fab, яку можна застосовувати для створення біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, обмінені варіабельні домени легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab (VL і VH відповідно). Однак навіть при зазначеному обміні доменів одержана біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, може містити певні побічні продукти, що утворилися у результаті так називаної взаємодії бенс-джонсовського типу між важкими і легкими ланцюгами (див. Schaefer і ін., PNAS, 108, 2011, ss. 11187-11191).

Для додаткового зниження помилкового спарювання важких і легких ланцюгів з різних молекул Fab і підвищення в результаті цього чистоти і виходу необхідної біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої в даному винаході, інтродукують заряджені амінокислоти з протилежними зарядами в конкретні амінокислотні положення в CH1- і CL-доменах або молекули(л) Fab клітини-мішені, що специфічно зв'язується(ються) з антигеном, або молекули Fab, що специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини. Модифікації зарядів здійснюють або в канонічній(их) молекулі(ах) Fab, що входить(ять) до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини (наприклад, представленої на фіг. 1 А-В, Е-З), або в кросовер-молекулі(ах) Fab, що входить(ять) до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, (наприклад, представленої на фіг. 1 Г-Д, І-Й) (але не в обох типах молекул). В конкретних варіантах здійснення винаходу модифікації зарядів здійснюють в канонічній(их) молекулі(ах) Fab, що входить(ять) до біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, (яка(які) в конкретних варіантах здійснення винаходу специфічно зв'язується(ються) з антигеном клітини-мішені).

В конкретному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, має здатність одночасно зв'язуватися з антигеном клітини-мішені, зокрема, антигеном пухлинної клітини, і з антигеном, який активує Т-клітини, зокрема, CD3. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, має здатність забезпечувати перехресне зшивання Т-клітини і клітини-мішені в результаті одночасного зв'язування з антигеном клітини-мішені і з антигеном, який активує Т-клітини. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу зазначене одночасне зв'язування приводить до лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначене одночасне зв'язування приводить до активації Т-клітини. В інших варіантах здійснення винаходу зазначене одночасне зв'язування приводить до клітинної відповіді Т-лімфоцита, насамперед цитотоксичного Т-лімфоцита, вибраної з групи, що включає: проліферацію, диференціювання, секрецію цитокінів, вивільнення цитотоксичних ефекторних молекул, цитотоксичну активність і експресію маркерів активації. В одному з варіантів здійснення винаходу зв'язування біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, з антигеном, який активує Т-клітини, зокрема, CD3, без одночасного зв'язування з антигеном клітини-мішені не приводить до Т-клітинної активації.

В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, має здатність переорієнтувати цитотоксичну активність Т-клітини до клітини-мішені. В конкретному варіанті здійснення винаходу зазначена переорієнтація не залежить від опосередкованої ГКС презентації пептидного антигена клітиною-мішенню і/або від специфічності Т-клітини.

Зокрема, відповідно до будь-якого з варіантів здійснення винаходу Т-клітина, пропонована у винаході, являє собою цитотоксичну Т-клітину. В деяких варіантах здійснення винаходу Т-клітина являє собою CD4⁺- або CD8⁺-Т-клітину, насамперед CD8⁺-Т-клітину.

Антигензв'язувальна молекула Fab, яка активує Т-клітини

Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході, містить принаймні одну молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини (яку в контексті даного опису позначають також як "антигензв'язувальна молекула Fab,

яка активує Т-клітини"). В конкретному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить не більше однієї молекули Fab (або іншу молекулу Fab), яка має здатність специфічно зв'язуватися з антигеном, що активує Т-клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу для біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, характерно одновалентне зв'язування з антигеном, що активує Т-клітини.

В конкретних варіантах здійснення винаходу молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, являє собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу Fab, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного. В зазначених варіантах здійснення винаходу молекула(и) Fab, яка(які) специфічно зв'язується(ються) з антигеном клітини-мішені, являє(ють) собою канонічну молекулу Fab. У варіантах здійснення винаходу, в яких більше однієї молекули Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені, міститься в біспецифічній антигензв'язувальній молекулі, яка активує Т-клітини, молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, переважно являє собою кросовер-молекулу Fab, а молекули Fab, які специфічно зв'язуються з антигеном клітини-мішені, являють собою канонічні молекули Fab.

В альтернативних варіантах здійснення винаходу молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном, який активує Т-клітини, являє собою канонічну молекулу Fab. В зазначених варіантах здійснення винаходу молекула(и) Fab, яка(які) специфічно зв'язується(ються) з антигеном клітини-мішені, являє(ють) собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу Fab, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюгів Fab обмінені/замінені один на одного.

В конкретному варіанті здійснення винаходу антиген, який активує Т-клітини, являє собою CD3, насамперед людський CD3 (SEQ ID NO: 1) або CD3 мавп циномолгус (SEQ ID NO: 2), найбільш переважно людський CD3. В конкретному варіанті здійснення винаходу антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, має перехресну реактивність до (тобто специфічно зв'язується з) CD3 людини і мавп циномолгус. В деяких варіантах здійснення винаходу антиген, який активує Т-клітини, являє собою епсилон-субодиницю CD3 (CD3 епсилон).

В деяких варіантах здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує антиген, який активує Т-клітини, специфічно зв'язується з CD3, насамперед CD3 епсилон, і містить принаймні одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого ланцюга, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 і SEQ ID NO: 6, і принаймні одну CDR легкого ланцюга, вибрану з групи SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10.

В одному з варіантів здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує CD3, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить CDR1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 4, CDR2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 5, CDR3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 6, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить CDR1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 8, CDR2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 9, і CDR3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 10.

В іншому варіанті здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує CD3, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить CDR1 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 4, CDR2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 67, CDR3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 6, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить CDR1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 68, CDR2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 9, і CDR3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 10.

В одному з варіантів здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує CD3, містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 3, і послідовність варіабельної області легкого ланцюга, яка принаймні приблизно на 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична SEQ ID NO: 7.

В одному з варіантів здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує CD3, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

В одному з варіантів здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує CD3, містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 3 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 7.

Молекула Fab, що зв'язує антиген клітини-мішені

Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонована у винаході,

містить принаймні одну молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені (позначена також в контексті даного опису як "молекула Fab, що зв'язує антиген клітини-мішені"). В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить дві молекули Fab, які специфічно зв'язуються з антигеном клітини-мішені. В конкретному зазначеному варіанті здійснення винаходу кожна з цих молекул Fab специфічно зв'язується з однією і тією ж антигенною детермінантою. У ще більш конкретному варіанті здійснення винаходу всі зазначені молекули Fab є ідентичними, тобто вони містять однакові амінокислотні послідовності, включаючи однакові амінокислотні заміни в CH1- і CL-домени, зазначені в даному описі (якщо вони присутні). В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить молекулу імуноглобуліну, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить не більше двох молекул Fab, які специфічно зв'язуються з антигеном клітини-мішені.

В конкретних варіантах здійснення винаходу молекула(и) Fab, яка(які) специфічно зв'язується(ються) з антигеном клітини-мішені, являє(ють) собою канонічну молекулу Fab. В зазначених варіантах здійснення винаходу молекула(и) Fab, яка(які) специфічно зв'язується(ються) з антигеном, який активує Т-клітини, являє(ють) собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу Fab, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюга Fab обмінені/замінені один на одного.

В альтернативних варіантах здійснення винаходу молекула(и) Fab, яка(які) специфічно зв'язується(ються) з антигеном клітини-мішені, являє(ють) собою кросовер-молекулу Fab, зазначену в даному описі, тобто молекулу Fab, в якій варіабельні домени VH і VL важкого і легкого ланцюга Fab обмінені/замінені один на одного. В зазначених варіантах здійснення винаходу молекула(и) Fab, яка(які) специфічно зв'язується(ються) з антигеном, що активує Т-клітини, являє(ють) собою канонічну молекулу Fab.

Молекула Fab, що зв'язує антиген клітини-мішені, зв'язується з конкретною антигенною детермінантою і має здатність направляти біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, до сайту-мішені, наприклад, до конкретного типу пухлинної клітини, яка несе зазначену антигенну детермінанту.

В деяких варіантах здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує антиген клітини-мішені, специфічно зв'язується з антигеном клітинної поверхні.

В деяких варіантах здійснення винаходу молекула Fab, яка зв'язує антиген клітини-мішені, спрямована до антигена, асоційованого з патологічним станом, такому як антиген, презентований пухлинною клітиною або інфікованою вірусом клітиною. Прийнятними антигенами є антигени клітинної поверхні, наприклад (але, не обмежуючись тільки ними), рецептори клітинної поверхні. В конкретних варіантах здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою людський антиген. Прикладами антигенів клітин-мішеней є CD20, Her2, Her3, MCSP (асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан, який відомий також як протеоглікан хондроїтинсульфату 4) або BCMA (людський В-клітинний антиген (мішень) дозрівання), який відомий також як представник суперсімейства рецепторів фактора некрозу пухлини 17 17 (UniProt Q02223)).

В конкретних варіантах здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою CD20, насамперед людський CD20. В одному з варіантів здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою CD20, і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з зазначеним антигеном клітини-мішені, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1, яка має SEQ ID NO: 46, CDR 2 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 47, і CDR 3 важкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 48, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить CDR 1 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 50, і CDR 3 легкого ланцюга, яка має SEQ ID NO: 51. В іншому варіанті здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою CD20, і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з зазначеним антигеном клітини-мішені, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 30, і варіабельну область легкого ланцюга, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 31. В наступному варіанті здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою CD20, і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з зазначеним антигеном клітини-мішені, містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 30 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 31. В конкретному варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить поліпептид, який принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний

[illegible]

Fab, яка специфічно зв'язується з зазначеним антигеном клітини-мішені, містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 63 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 64. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить поліпептид, який принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 21, поліпептид, який принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 55, поліпептид, який принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 56, і поліпептид, який принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 57. В іншому варіанті здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, містить поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 21, поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 55, поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 56 і поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 57.

В інших варіантах здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою асоційований з меланою хондроїтинсульфат-протеоглікан (MCSP), насамперед людський MCSP. В одному з варіантів здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою MCSP, і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з зазначеним антигеном клітини-мішені, містить варіабельну область важкого ланцюга, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 65, і варіабельну область легкого ланцюга, яка принаймні на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична послідовності SEQ ID NO: 66. В наступному варіанті здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою MCSP, і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з зазначеним антигеном клітини-мішені, містить послідовність варіабельної області важкого ланцюга SEQ ID NO: 65 і послідовність варіабельної області легкого ланцюга SEQ ID NO: 66.

В деяких варіантах здійснення винаходу антиген клітини-мішені являє собою BCMA. В інших варіантах здійснення винаходу антиген клітини-мішені не являє собою BCMA.

Полінуклеотиди

Винахід також відноситься до виділених полінуклеотидів, які кодують біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, представлену в даному описі, або її фрагмент. В деяких варіантах здійснення винаходу зазначений фрагмент являє собою антигензв'язувальний фрагмент.

Полінуклеотиди, які кодують біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, можна експресувати у вигляді індивідуального полінуклеотиду, який кодує повну біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, або у вигляді декількох (наприклад, двох або більшої кількості) спільно експресованих полінуклеотидів. Поліпептиди, що кодуються спільно експресованими полінуклеотидами, можна з'єднувати, наприклад, через дисульфідні зв'язки або іншими шляхами з утворенням функціональної біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини. Наприклад, частина молекули Fab, яка являє собою легкий ланцюг, може кодуватися полінуклеотидом, відмінним від полінуклеотиду, який кодує частину біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що являє собою важкий ланцюг молекули Fab, субодиноцю Fc-домену і необов'язково іншу молекулу Fab (її частину). При спільній експресії поліпептиди важкого ланцюга повинні зв'язуватися з поліпептидами легкого ланцюга з утворенням молекули Fab. В іншому прикладі частина біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, яка містить одну з двох субодиноць Fc-домену і необов'язково одну або декілька молекул Fab (їх частини), може кодуватися полінуклеотидом, відмінним від полінуклеотиду, який кодує частину антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, що містить другу з двох субодиноць Fc-домену і необов'язково молекулу Fab (її частину). При спільній експресії субодиноці Fc-домену повинні зв'язуватися з утворенням Fc-домену.

В деяких варіантах здійснення винаходу виділений полінуклеотид кодує повну зазначену в даному описі біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході. В інших варіантах здійснення винаходу виділений полінуклеотид кодує поліпептиди, що входять до зазначеної в даному описі біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході.

В деяких варіантах здійснення винаходу полінуклеотид або нуклеїнова кислота являє собою ДНК. В інших варіантах здійснення винаходу полінуклеотид, пропонований в даному винаході, являє собою РНК, наприклад, в формі матричної РНК (мРНК). РНК, пропонована в даному винаході, може бути одноланцюговою або дволанцюговою.

Методи рекомбінації

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, можна одержувати, наприклад, шляхом твердофазового пептидного синтезу (наприклад,

твердофазовий синтез Меріфілда) або методом рекомбінації. Для рекомбінантного одержання один або декілька полінуклеотидів, що кодують біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, (фрагмент), наприклад, описану вище, виділяють і вбудовують в один або декілька векторів для додаткового клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Зазначений

5 полінуклеотид можна легко виділяти і секвенувати за допомогою загальноприйнятих процедур. Одним з варіантів здійснення винаходу є вектор, переважно експресійний вектор, що містить один або декілька полінуклеотидів, пропонувані у винаході. Методи, добре відомі спеціалістам в даній галузі, можна застосовувати для конструювання експресійних векторів, які містять

10 кодуєчу послідовність біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини (фрагмента) разом з відповідними контролюючими транскрипцію/трансляцію сигналами. Ці методи включають технології рекомбінантної ДНК *in vitro*, методи синтезу і рекомбінації/генетичної рекомбінації *in vivo* (див., наприклад, методи, описані у Maniatis і ін., Maniatis і ін., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, в-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; і Ausubel і ін., *Current Protocols in Molecular Biology*, в-во Greene Publishing Associates and

15 Wiley Interscience, N.Y., 1989). Експресійний вектор може являти собою частину плазміди, вірусу або може являти собою фрагмент нуклеїнової кислоти. Експресійний вектор включає касету експресії, в якій полінуклеотид, що кодує біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини (фрагмент) (тобто кодуєчу область), клонують із забезпеченням функціональної зв'язки з промотором і/або іншими елементами, контролюючими транскрипцію

20 або трансляцію. У контексті даного опису "кодуєча область" являє собою частину нуклеїнової кислоти, яка складається з кодонів, що трансклюються в амінокислоти. Хоча "стоп-кодон" (TAG, TGA або TAA) не трансклюється в амінокислоту, він, у випадку його присутності, може розглядатися як частина кодуєчої області, однак будь-які фланкуючі послідовності, наприклад, промотори, сайти зв'язування рибосом, термінатори транскрипції, інтрони, 5'- і 3'-нетрансльовані області і т.п., не є частиною кодуєчої області. Дві або більша кількість кодуєчих

25 областей може бути присутньою в індивідуальній полінуклеотидній конструкції, наприклад, індивідуальному векторі, або в окремих полінуклеотидних конструкціях, наприклад, окремих (різних) векторах. Крім того, будь-який вектор може містити одну кодуєчу область або може містити дві або більшу кількість кодуєчих областей, наприклад, вектор, пропонуваний в даному

30 винаході, може кодувати один або декілька поліпептидів, які пост- або співтрансляційно розділяються на кінцеві білки за допомогою протеолітичного розщеплення. Крім того, вектор, полінуклеотид або нуклеїнова кислота, пропонуваний/пропонувана у винаході, може кодувати гетерологічні кодуєчі області, або злиті, або не злиті з полінуклеотидом, який кодує біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, (фрагмент), пропонувану у

35 винаході, або її варіант або похідну. Гетерологічні кодуєчі області включають (але, не обмежуючись тільки ними) спеціалізовані елементи або мотиви, такі як секреторний сигнальний пептид або гетерологічний функціональний домен. Функціональний зв'язок має місце, коли кодуєча область генного продукту, наприклад поліпептиду, асоційована з однією або декількома регуляторними послідовностями таким чином, щоби експресія генного продукту

40 знаходилась під впливом або контролем регуляторної(их) послідовності(ей). Два ДНК-фрагмента (таких як кодуєча область поліпептиду і асоційований з нею промотор) є "функціонально зв'язаними", якщо індукція промоторної функції приводить до транскрипції мРНК, що кодує необхідний генний продукт, і якщо природа зв'язку між двома ДНК-фрагментами не здійснює впливу на здатність регулюючих експресію послідовностей

45 направляти експресію генного продукту, або не здійснює впливу на здатність ДНК-матриці до транскрипції. Таким чином, промоторна область повинна бути функціонально зв'язана з нуклеїновою кислотою, кодуєчою поліпептид, якщо промотор має здатність здійснювати транскрипцію нуклеїнової кислоти. Промотор може являти собою специфічний для клітини промотор, який забезпечує значну транскрипцію ДНК тільки в попередньо відібраних клітинах.

50 Інші контролюючі транскрипцію елементи, окрім промотора, наприклад, енхансери, оператори, репресори і сигнали термінації транскрипції, можна функціонально зв'язувати з полінуклеотидом для забезпечення специфічної для клітини транскрипції. Прийнятні промотори і інші контролюючі транскрипцію області представлені в даному описі. Спеціалістам в даній галузі відомо широку різноманітність контролюючих транскрипцію областей. Вони включають

55 (але, не обмежуючись тільки ними) контролюючі транскрипцію області, які функціонують в клітинах хребетних тварин, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) сегменти промоторів і енхансерів з цитомегаловірусів (наприклад, негайно-ранній промотор в поєднанні з інтроном-А), мавпячого вірусу 40 (наприклад, ранній промотор) і ретровірусів (таких як вірус саркоми Рауса). Інші контролюючі транскрипцію області включають області, які походять з генів хребетних

60 тварин, таких як ген актину, білка теплового шоку, бичачого гормону росту і кролячого β -глобіну,

а також інші послідовності, які можуть контролювати експресію генів в еукаріотичних клітинах. Додаткові прийнятні контролюючі транскрипцію області включають тканеспецифічні промотори і енхансери, а також індукційні промотори (наприклад, промотори, індуковані тетрациклінами). Аналогічно цьому, звичайним спеціалістам в даній галузі відомо широку різноманітність контролюючих трансляцію елементів. Вони включають (але, не обмежуючись тільки ними) сайти зв'язування рибосом, кодони ініціації трансляції і термінувальні кодони і елементи, що походять з вірусних систем (зокрема внутрішній сайт зв'язування (посадки) рибосом або IRES, який позначають також як CITE-послідовність). Касета експресії може включати також інші характерні структури, такі як сайт ініціації реплікації і/або інтегровані в хромосому елементи, такі як довгі кінцеві повтори (LTR) ретровірусів, або інвертовані кінцеві повтори (ITR) аденоасоційованого вірусу (AAV).

Кодуючі області полінуклеотиду і нуклеїнової кислоти, пропоновані в даному винаході, можуть бути асоційовані з додатковими кодуєчими областями, які кодують секреторні або сигнальні пептиди, які спрямовують секрецію поліпептиду, що кодується полінуклеотидом, пропонованим в даному винаході. Наприклад, якщо потрібна секреція біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, то ДНК, кодуєчу сигнальну послідовність, можна поміщати проти ходу транскрипції відносно нуклеїнової кислоти, кодуєчою біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, або її фрагмент. Відповідно до гіпотези, що стосується сигналів, білки, які секретуються клітинами ссавців, мають сигнальний пептид або секреторну лідерну послідовність, який/яка відщеплюється від зрілого білка після ініціації експорту білкового ланцюга, що росте, через шорсткуватий ендоплазматичний ретикулум. Звичайним спеціалістам в даній галузі повинно бути очевидно, що поліпептиди, які секретуються клітинами хребетних тварин, як правило, мають сигнальний пептид, злитий з N-кінцем поліпептиду, який відщеплюється від трансльованого поліпептиду з утворенням секретованої або "зрілої" форми поліпептида. В деяких варіантах здійснення винаходу використовують нативний сигнальний пептид, наприклад, сигнальний пептид важкого ланцюга або легкого ланцюга імуноглобуліну або функціональну похідну зазначеної послідовності, яка зберігає здатність забезпечувати секрецію поліпептиду, функціонально зв'язаного з ним. Альтернативно цьому, можна застосовувати гетерологічний сигнальний пептид ссавців або його функціональну похідну. Наприклад, лідерну послідовність дикого типу можна замінювати на лідерну послідовність людського тканинного активатора плазміногена (ТРА) або мишачої β-глюкуронідази.

ДНК, кодуєчу коротку білкову послідовність, яку можна застосовувати для полегшення подальшої очистки (наприклад, гістидинову мітку), або призначену для мічення біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, можна включати всередину або на кінці полінуклеотиду, що кодує біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, (фрагмент).

Додатковим варіантом здійснення винаходу є клітина-хазяїн, яка містить один або декілька полінуклеотидів, пропонованих у винаході. Деякими варіантами здійснення винаходу є клітина-хазяїн, яка містить один або декілька векторів, пропонованих у винаході. Полінуклеотиди і вектори можуть мати будь-які особливості, індивідуально або в поєднанні, зазначені в даному описі стосовно полінуклеотидів і векторів відповідно. В одному з таких варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн містить (наприклад, трансформована або трансфектована) вектор, який містить полінуклеотид, який кодує біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході (або її частину). В контексті даного опису поняття "клітина-хазяїн" відноситься до будь-якого типу клітинної системи, яку можна конструювати для одержання біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонованих у винаході, або їх фрагментів. Клітини-хазяї, придатні для реплікації і для підтримки експресії біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, добре відомі в даній галузі. Такі клітини можна трансфектувати або трансдукувати відповідним чином конкретним експресійним вектором і можна вирощувати більшу кількість клітин, які містять вектор, з метою внесення в ферментери для великомасштабних процесів одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини в достатніх для клінічних застосувань кількостях. Прийнятними клітинами-хазяями є прокаріотичні мікроорганізми, такі як E. coli, або різні еукаріотичні клітини, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини комарів або т.п. Наприклад, поліпептиди можна одержувати в бактеріях, зокрема, коли відсутня потреба в глікозилюванні. Після експресії поліпептид можна виділяти з пасти бактеріальних клітин в розчинну фракцію і можна додатково очищати. Окрім прокаріот, як хазяї для клонування або експресії векторів, які кодують поліпептид, можна використовувати еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі, включаючи штами грибів і дріжджів, шляхи глікозилювання

яких були "гуманізовані", що дозволяє одержувати поліпептид з частково або повністю людського схемою глікозилювання (див. Gerngross, Nat. Biotech. 22, 2004, сс. 1409-1414 і Li і ін., Nat. Biotech. 24, 2006, сс. 210-215). Клітини-хазяї, які можна використовувати для експресії (глікозилюваних) поліпептидів, одержують також з багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних тварин). Прикладами клітин безхребетних є клітини комах, а також можна застосовувати клітини рослин. Були виявлені численні бакуловірусні штами і відповідні придатні для них як хазяї клітини комах, насамперед для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*. Як хазяї можна застосовувати також культури рослинних клітин (див., наприклад, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (опис технології PLANTIBODIES™ для одержання антитіл в трансгенних рослинах). Як хазяї можна застосовувати також клітини хребетних тварин. Наприклад, можна використовувати клітинні лінії ссавців, які адаптовані до росту в суспензії. Іншими прикладами прийнятних ліній клітин-хазяїв ссавців є лінія клітин нирки мавпи CV1, трансформована за допомогою SV40 (COS-7); лінія клітин нирки ембріона людини (293, Graham і ін., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клітини нирки дитинчати хом'яка (BHK); клітини Сертоли миші (TM4-клітини, описані, наприклад, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мартишки (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки бичачого щура (BRL 3A); клітини легені людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, описані, наприклад, у Mather і ін., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клітини MRC 5 і клітини FS4. Іншими цінними лініями клітин-хазяїв ссавців є клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи dhfr-CHO-клітини (Urlaub і ін., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); і клітинні лінії мієломи, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд конкретних ліній клітин-хазяїв ссавців, які можна застосовувати для виробництва білка, див., наприклад, у Yazaki і Wu, в: *Methods in Molecular Biology* під ред. B.K.C. Lo, в-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клітини-хазяї включають культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, клітини дріжджів, клітини комах, клітини бактерій і клітини рослин (але не обмежуючись тільки ними), а також клітини, що знаходяться в організмі трансгенної тварини, трансгенної рослини або культивованій рослинній або тваринній тканині. В одному з варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, переважно клітину ссавця, таку як клітина яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітина нирки людського ембріону (HEK) або лімфоїдна клітина (наприклад, клітина Y0, NS0, Sp20).

В даній галузі відомі стандартні технології для експресії чужорідних генів в цих системах. Клітини, експресуючі поліпептид, що містить або важкий, або легкий ланцюг антигензв'язувального домену, такого як антитіло, можна конструювати таким чином, щоби в них відбувалася експресія інших ланцюгів антитіла, наприклад, таким чином, щоби продукт, який експресується, являв собою антитіло, яке має як важкий, так і легкий ланцюг.

Одним з варіантів здійснення винаходу є спосіб одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, який полягає в тому, що культивують клітину-хазяїна, яка містить полінуклеотид, який кодує біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, представлену в даному описі, в умовах, придатних для експресії біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, і виділяють біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, з клітини-хазяїна (або культурального середовища клітини-хазяїна).

Компоненти біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини генетично зливають одна з одною. Біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, можна створювати так, щоби її компоненти зливати один з одним безпосередньо або опосередковано через лінкерну послідовність. Склад і довжину лінкера можна визначати за допомогою методів, добре відомих в даній галузі, і можна оцінювати ефективність. Приклади лінкерних послідовностей, розташованих між різними компонентами біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, представлені в наведених в даному описі послідовностях. Можна включати також додаткові послідовності для вбудовування сайту розщеплення, якщо потрібне розділення індивідуальних компонентів злиття, наприклад, послідовність, що розпізнається ендопептидазою.

В деяких варіантах здійснення винаходу один або декілька антигензв'язувальних фрагментів біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини містить(ять) принаймні варіабельну область антитіла, яка має здатність зв'язуватися з антигенною детермінантою. Варіабельні області можуть утворювати частину антитіл, що зустрічаються в природних умовах або не зустрічаються в природних умовах, або їх фрагментів або можуть походити з них. Методи одержання поліклональних антитіл і моноклональних антитіл добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Harlow і Lane, "Antibodies: a Laboratory Manual", в-во Cold Spring Harbor

Laboratory, 1988). Антитіла, що не зустрічаються в природних умовах, можна створювати за допомогою твердофазового пептидного синтезу, можна одержувати за допомогою методів рекомбінації (наприклад, описаних в US № 4186567) або можна одержувати, наприклад, шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек, які містять варіабельні області важких ланцюгів і варіабельні області легких ланцюгів (див., наприклад, US № 5969108 на ім'я McCafferty).

Антитіла, фрагменти антитіл, антигензв'язувальні домени або варіабельні області з будь-яких видів тварин можна застосовувати в біспецифічних антигензв'язувальних молекулах, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході. Прикладами антитіл, фрагментів антитіл, антигензв'язувальних доменів або варіабельних областей, які можна застосовувати відповідно до даного винаходу, є (але, не обмежуючись тільки ними) конструкції, одержані з організму мишей, приматів або людини. Якщо біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, призначена для застосування на людині, то можна використовувати химерну форму антитіла, в якій константні області антитіла одержують з людського антитіла. Гуманізовану або повністю людську форму антитіла можна одержувати також за допомогою методів, добре відомих в даній галузі (див., наприклад, US № 5565332 на ім'я Winter). Для здійснення гуманізації можна застосовувати різні методи, такі як (але, не обмежуючись тільки ними) (а) трансплантація нелюдських (наприклад, з антитіла-донора) CDR в людську (наприклад, антитіло-реципієнт) каркасну ділянку і константні області, які зберігають або не зберігають залишки каркасної ділянки, що мають вирішальне значення (наприклад, залишки, важливі для збереження хорошої антигензв'язувальної афінності або функцій антитіла), (б) трансплантація тільки нелюдських ділянок, які визначають специфічність (SDR або a-CDR; залишки мають вирішальне значення для взаємодії антитіло-антиген) в людські каркасні і константні області, або (в) трансплантація повних нелюдських варіабельних доменів, але їх "маскування" сегментом, що нагадує людський, шляхом заміни поверхневих залишків. Огляд гуманізованих антитіл і методів їх одержання див., наприклад, у Almagro і Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, і вони описані також, наприклад, у Riechmann і ін., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen і ін., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US, №№ 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Jones і ін., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison і ін., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison і Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeyen і ін., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immun* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri і ін., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (опис трансплантації SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol Immunol* 28, 1991, сс. 489-498 (опис "повторного покриття"); Dall'Acqua і ін., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (опис "перестановки FR") і Osbourn і ін., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, і Klimka і ін., *Br J Cancer* 83, 2000, сс. 252-260 (опис підходу на основі "цілеспрямованої селекції" для перестановки FR).

Людські антитіла і людські варіабельні області можна одержувати за допомогою різних методик, відомих в даній галузі. Людські антитіла описані у цілому, у van Dijk і van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 і Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459. Людські варіабельні області можуть утворювати частину людських моноклональних антитіл або можуть бути одержані з них за допомогою методу гібридом (див., наприклад, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, в-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Людські антитіла і людські варіабельні області можна одержувати також шляхом введення іммуногена трансгенній тварині, яка модифікована таким чином, що може продукувати інтактні людські антитіла або інтактні антитіла з людськими варіабельними областями у відповідь на контрольне зараження антигеном (див., наприклад, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Людські антитіла і людські варіабельні області можна створювати також шляхом виділення послідовностей варіабельних областей Fv-клонів, відрізнених з людських фагових дисплейних бібліотек (див., наприклад, Hoogenboom і ін. в: *Methods in Molecular Biology*, під ред. O'Brien і ін., в-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); і McCafferty і ін., *Nature* 348, 552-554; Clackson і ін., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, як правило, експонує фрагменти антитіл або у вигляді одноланцюгових Fv- (scFv)-фрагментів, або у вигляді Fab-фрагментів.

В деяких варіантах здійснення винаходу антигензв'язувальні фрагменти, придатні для застосування відповідно до даного винаходу, створюють так, щоби вони мали підвищену афінність зв'язування, наприклад, за допомогою методів, описаних в публікації заявки на патент США № 2004/0132066, повний зміст якої включено в даний опис як посилання. Здатність біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, зв'язуватися зі специфічною антигенною детермінантою можна оцінювати кількісно або за допомогою твердофазового ферментного аналізу (ELISA), або іншими методиками, відомими спеціалісту в даній галузі, наприклад, за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу (здійснюючи аналіз з використанням системи BIACORE T100) (Liljeblad і ін., *Glyco J* 17, 2000, сс. 323-329), і традиційних аналізів зв'язування (Heeley, *Endocr Res* 28, 2002, сс. 217-

229). Аналізи в умовах конкуренції можна застосовувати для ідентифікації антитіла, фрагмента антитіла, антигензв'язувального домену або варіабельного домену, що конкурує з референс-антитілом за зв'язування з конкретним антигеном, наприклад, антитіла, яке конкурує з антитілом V9 за зв'язування з CD3. В деяких варіантах здійснення винаходу зазначене конкуруюче антитіло зв'язується з тим же епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), з яким зв'язується референс-антитіло. Докладні наведені як приклади методи картування епітопа, з яким зв'язується антитіло, представлені у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в: Methods in Molecular Biology, в-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При здійсненні наведеного як приклад аналізу в умовах конкуренції іммобілізований антиген (наприклад, CD3) інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, яке зв'язується з антигеном (наприклад, антитіло V9, описане в US 6054297), і друге немічене антитілом, яке підлягає тестуванню щодо його здатності конкурувати з першим антитілом за зв'язування з антигеном. Друге антитіло може бути присутнім в супернатанті гібридоми. Як контроль іммобілізований антиген інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, але не містить друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, які забезпечують зв'язування першого антитіла з антигеном, надлишок незв'язаного антитіла видаляють і оцінюють кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим антигеном. Якщо кількість мітки, асоційованої з іммобілізованим антигеном, істотно знижена в тестованому зразку у порівнянні з контрольним зразком, то це свідчить про те, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з антигеном (див. Harlow і Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, в-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, одержані за допомогою представлених в даному описі методів, можна очищати з використанням відомих в даній галузі методик, таких як рідинна хроматографія високого розрізнення, іонообмінна хроматографія, гель-електрофорез, афінна хроматографія, гель-фільтрація і т.п. Фактичні умови, застосовувані для очистки конкретного білка, залежать, зокрема, від таких факторів, як чистий заряд, гідрофобність, гідрофільність і т.д., і вони повинні бути очевидні спеціалісту в даній галузі. Для очистки антитіла за допомогою афінної хроматографії можна використовувати ліганд, рецептор або антиген, з яким зв'язується біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини. Наприклад, для очистки за допомогою афінної хроматографії біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонується у винаході, можна використовувати матрикс з білком А або білком G. Наприклад, послідовне застосування афінної хроматографії на білку А або G і гель-фільтрації можна застосовувати для виділення біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, практично відповідно до методу, що описаний в розділі "Приклади". Чистоту біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини можна визначати за допомогою будь-якого з широкої різноманітності добре відомих аналітичних методів, включаючи гель-електрофорез, рідинну хроматографію високого тиску і т.п. Наприклад, встановлено, що злиті білки, які містять важкі ланцюги і які експресували відповідно до описаним в розділі "Приклади" методів, є інтактними і вірно складеними, що продемонстровано за допомогою ДСН-ПААГ в відновних умовах (див., наприклад, фіг. 3). Розділяли три смуги, що відповідають приблизно Mr 25000, Mr 50000 і Mr 75000, які відповідали передбаченим молекулярним масам легкого ланцюга, важкого ланцюга і злитому білку важкий ланцюг/легкий ланцюг біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини.

Аналізи

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, представлені в даному описі, можна ідентифікувати, піддавати скринінгу або характеризувати їх фізичні/хімічні властивості і/або види біологічної активності за допомогою різних аналізів, відомих в даній галузі.

Аналізи афінності

Афінність біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, до Fc-рецептора або антигена-мішені можна визначати за допомогою методів, викладених в розділі "Приклади", за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (SPR), використовуючи стандартну інструментальну базу, наприклад, пристрій BIAcore (фірма GE Healthcare), і рецептори або білки-мішені, які можна одержувати за допомогою рекомбінантної експресії. Альтернативно цьому, зв'язування біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, з різними рецепторами або антигенами-мішенями можна оцінювати з використанням клітинних ліній, експресуючих конкретний рецептор або антиген-мішень, наприклад, за допомогою протокової цитометрії (FACS). Конкретний ілюстративний і наведений як приклад варіант вимірювання афінності зв'язування описаний нижче в розділі "Приклади".

Відповідно до одного з варіантів здійснення винаходу величину K_D вимірювали методом

поверхневого плазмонного резонансу за допомогою пристрою BIACORE® T100 (фірма GE Healthcare) при 25°C.

Для аналізу взаємодії між Fc-областю і Fc-рецепторами мічений за допомогою His рекомбінантний Fc-рецептор "захоплювали" за допомогою антитіла до пента-His (фірма Qiagen), імобілізованого на CM5-чипах, і біспецифічні конструкції застосовували як аналізовані субстанції (аналіти). В цілому, метод полягав у наступному: біосенсорні чипи з карбоксиметилованого декстрану (CM5, фірма GE Healthcare) активували за допомогою гідрохлориду N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл) карбодііміду (EDC) і N-гідрокисукциніміду (NHS) відповідно до інструкцій постачальника. Антитіло до пента-His розводили 10мМ ацетатом натрію, рН 5,0 до концентрації 40 мкг/мл перед ін'єкцією зі швидкістю потоку 5 мкл/хв для досягнення приблизно 6500 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції ліганду ін'єктували 1М етаноламін для блокади груп, що не прореагували. Потім здійснювали "захоплення" Fc-рецептора протягом 60 с в концентрації 4 або 10нМ. Для кінетичних вимірювань ін'єктували чотирикратні серійні розведення біспецифічної конструкції (діапазон від 500 до 4000нМ) в буфері HBS-EP+ (фірма GE Healthcare, 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, 3мМ ЕДТК, 0,05 % сурфактанту P20, рН 7,4) при 25°C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв протягом 120 с.

Для визначення афінності до антигена-мішені біспецифічні конструкції "захоплювали" за допомогою специфічного щодо людського Fab антитіла (фірма GE Healthcare), яке імобілізували на поверхні активованого сенсорного CM5-чипа відповідно до методу, описаного для антитіла до пента-His. Кінцева кількість зшитого білка становила приблизно 12000 RU. Здійснювали "захоплення" біспецифічних конструкцій протягом 90 с в концентрації 300нМ. Антигени-мішені пропускали через проточні комірки протягом 180 с в діапазоні концентрацій від 250 до 1000нМ зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Моніторинг дисоціації здійснювали протягом 180 с.

Відмінності всіх показників заломлення коректували шляхом віднімання відповіді, отриманої в проточній референс-комірці. Відповідь на стаціонарній стадії використовували для визначення константи дисоціації (K_D) за допомогою апроксимації нелінійної кривої ізотерми зв'язування Ленгмюра. Швидкість реакції асоціації (k_{on}) і реакції дисоціації (k_{off}) розраховували з використанням простої моделі зв'язування Ленгмюра 1:1 (програма BIACORE® T100 Evaluation Software, версія 1.1.1) шляхом одночасної апроксимації сенсограм асоціації і дисоціації. Константу рівноваги реакції дисоціації (K_D) розраховували як співвідношення k_{off}/k_{on} (див., наприклад, Chen і ін., J Mol Biol 293, 1999, сс. 865-881).

Аналізи активності

Біологічну активність біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, можна визначати за допомогою різних аналізів, описаних в розділі "Приклади". Види біологічної активності можуть включати, наприклад, індукцію проліферації Т-клітин, індукцію передачі сигналу в Т-клітинах, індукцію експресії маркерів активації в Т-клітинах, індукцію секреції цитокінів Т-клітинами, індукцію лізису клітин-мішеней, таких як пухлинні клітини, і індукцію регресу пухлини і/або підвищення виживаності.

Композиції, препаративні форми і шляхи введення

Наступним об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, які містять будь-яку з біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, представлених в даному описі, наприклад, призначені для застосування в будь-якому з зазначених нижче терапевтичних способів. В одному з варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яку з біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, представлених в даному описі, і фармацевтично прийнятний носій. В іншому варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яку з біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, представлених в даному описі, і принаймні один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, зазначений нижче.

Крім того, представлений спосіб одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, в формі, яка придатна для введення *in vivo*, який полягає в тому, що (а) одержують біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, проповану у винаході, і (б) об'єднують в препаративній формі біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, принаймні з одним фармацевтично прийнятним носієм, де приготований препарат біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини придатний для застосування *in vivo*.

Фармацевтичні композиції, пропоновані в даному винаході, містять в терапевтично ефективній кількості одну або декілька біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, яка(і) розчинена(і) або диспергована(і) в фармацевтично прийнятному носії. Поняття "фармацевтично або фармакологічно прийнятний" відноситься до молекулярних субстанцій і композицій, які, у цілому, нетоксичні для реципієнтів в застосовуваних дозах і

концентраціях, тобто не викликають шкідливі, алергічні або інші небажані реакції при введенні за необхідності тварині, такій, наприклад, як людина. Приготування фармацевтичної композиції, яка містить принаймні одну біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, і необов'язково додаткову діючу речовину, повинно бути очевидним спеціалістам в даній галузі в світлі даного опису, наприклад, з довідника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-те вид., в-во Mack Printing Company, 1990, включеного в даний опис як посилання. Крім того, очевидно, що препарати, призначені для введення тварині (наприклад, людині), повинні задовольняти вимогам стандартів стерильності, пірогенності і загальної безпеки і чистоти, розроблених відділенням біологічних стандартів FDA (Управління контролю харчових продуктів і лікарських засобів) або відповідним уповноваженим органом інших країн. Кращими композиціями є ліофілізовані препаративні форми або водні розчини. У контексті даного опису "фармацевтично прийнятний носій" включає будь-які і всі розчинники, буфери, дисперсійні середовища, покриття, поверхнево активні речовини, антиоксиданти, консерванти (наприклад, антибактеріальні агенти, протигрибкові агенти), агенти для надання ізотонічності, агенти, що уповільнюють абсорбцію, солі, білки, лікарські засоби, стабілізатори лікарських засобів, полімери, гелі, зв'язувальні речовини, ексципієнти, розпушувачі, замаслювачі, підсолоджуючі речовини, коригенти, барвники і подібні матеріали і їх комбінації, які повинні бути відомі звичайному спеціалісту в даній галузі (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-те вид., в-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включений в даний опис як посилання). В терапевтичних або фармацевтичних композиціях можна застосовувати будь-якої загальноприйнятий носій, якщо тільки він сумісний з діючою речовиною.

Композиція може містити різні типи носіїв залежно від того, чи вводять її в твердій, рідкій або аерозольній формі, і від того, чи повинна вона бути стерильною, як у випадку використання таких шляхів введення, як ін'єкція. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані в даному винаході (і будь-який додатковий терапевтичний засіб), можна вводити внутрішньовенно, внутрішньошкірно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревно, всередину ушкодження, всередину черепа, всередину суглоба, всередину передміхурової залози, всередину селезінки, внутрішньоренально, внутрішньоплеврально, внутрішньотрахеально, внутрішньоанально, всередину скловидного тіла, внутрішньовагінально, внутрішньоректально, всередину пухлини, внутрішньом'язово, внутрішньочеревно, підшкірно, підкон'юнктивально, інтравезикулярно, в слизову оболонку, інтраперикардіально, всередину пуповини, інтраокулярно, орально, топікально, місцево, шляхом інгаляції (наприклад, аерозольної інгаляції), ін'єкції, інфузії, безперервної інфузії, локалізованої перфузії, що омиває безпосередньо клітини-мішені, через катетер, за допомогою лаважа, у вигляді кремів, в ліпідних композиціях (наприклад, ліпосомах), або за допомогою будь-якого іншого методу або будь-якої комбінації вищезазначених шляхів, відомих звичайному спеціалісту в даній галузі (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-те вид., в-во Mack Printing Company, 1990, включений в даний опис як посилання). Для введення молекул поліпептидів, таких як біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, найбільш часто застосовують парентеральне введення, зокрема, внутрішньовенну ін'єкцію.

Парентеральні композиції включають композиції, створені для введення шляхом ін'єкції, наприклад, підшкірної, внутрішньошкірної, всередину ушкодження, внутрішньовенної, внутрішньоартеріальної, внутрішньом'язової, підоболонкової або внутрішньочеревної ін'єкції. Для ін'єкції біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, можна включати в препаративні форми у вигляді водних розчинів, переважно в фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний соляний буфер. Розчин може містити призначені для одержання препаративної форми агенти, такі як суспендуєчі, стабілізуючі і/або диспергуючі агенти. Альтернативно цьому, біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, можуть знаходитись в порошкоподібній формі, що призначена для відновлення перед застосуванням прийнятним наповнювачем, наприклад, стерильною водою, що не містить пірогенів. Стерильні ін'єковані розчини приготують шляхом включення біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, пропонуваних у винаході, в необхідній кількості у відповідний розчинник за потреби в поєднанні з різними іншими інгредієнтами, перерахованими нижче. Стерильність можна легко забезпечувати, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани. Як правило, дисперсії одержують шляхом включення різних стерилізованих діючих речовин в стерильний наповнювач, який містить основне дисперсійне середовище і/або інші інгредієнти. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних розчинів, суспензій або емульсій для ін'єкцій кращими методами одержання є вакуумне сушіння або сушіння виморожуванням, які

дозволяють одержувати порошок діючої речовини в поєднанні з будь-яким додатковим необхідним інгредієнтом з попередньо стерилізованого фільтруванням рідкого середовища. За потреби рідке середовище перед здійсненням ін'єкції повинно бути відповідним чином забуферене і рідкому розріджувачу спочатку надана ізотонічність за допомогою достатньої кількості соляного розчину або глюкози. Композиція повинна бути стабільною в умовах приготування і зберігання і захищена від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби. Прийнято підтримувати забруднення ендотоксинами на мінімальному безпечному рівні, наприклад, менше 0,5 нг/мг білка. Придатні фармацевтично прийнятні носії включають (але не обмежуючись тільки ними): буфери, такі як фосфатний, цитратний і буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонійхлорид; гексаметонійхлорид; бензалконійхлорид; бензетонійхлорид; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол, резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол і мета-крезол); низькомолекулярні (які містять менше приблизно 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТК; сахара, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протіюни, такі як натрій; комплекси з металами (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіоногенні поверхнево активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити сполуки, які підвищують в'язкість суспензії, такі як натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, сорбіт, декстран або т.п. Необов'язково суспензія може містити також прийнятні стабілізатори або агенти, які підвищують розчинність сполук, що дозволяє одержувати висококонцентровані розчини. Крім того, суспензії діючих речовин можна одержувати у вигляді відповідних масляних призначених для ін'єкції суспензій. Прийнятні ліпофільні розчинники або наповнювачі включають жирні нелеткі масла, такі як кунжутна олія, або синтетичні ефіри жирних кислот, такі як етилолеати або тригліцериди, або ліпосоми.

Діючі речовини можна включати в мікрокапсули, наприклад, одержані за допомогою методів коацервації або міжфазової полімеризації, наприклад в гідроксипропілметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і полі(метилметакрилатні) мікрокапсули відповідно, в колоїдні системи введення лікарського засобу (наприклад, в ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи описані в Remington's Pharmaceutical Sciences (18-те вид., в-во Mack Printing Company, 1990). Можна приготувати препарати з уповільненим вивільненням. Прийнятними прикладами препаратів з уповільненим вивільненням є напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, включаючи поліпептид, такі матриці являють собою вироби певної форми, наприклад, плівки або мікрокапсули. В конкретному варіанті здійснення винаходу для досягнення пролонгованої абсорбції композиції, що ін'єктуються, в композиції можна застосовувати агенти, які уповільнюють абсорбцію, такі, наприклад, як моностеарат алюмінію, желатин або їх комбінації.

Окрім описаних вище композицій, біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, можна приготувати також у вигляді препарату в формі депо. Зазначені препаративні форми тривалої дії можна застосовувати шляхом імплантації (наприклад, підшкірної або внутрішньом'язової) або внутрішньом'язової ін'єкції. Так, наприклад, біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, можна включати в препаративні форми в поєднанні з прийнятними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії в прийнятному маслі) або іонообмінними смолами, або у вигляді помірно розчинних похідних, наприклад, помірно розчинної солі.

Фармацевтичні композиції, які містять біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, можна приготувати за допомогою загальноприйнятих процесів змішування, розчинення, емульгування, капсулювання, захоплення або ліофілізації. Фармацевтичні композиції можна включати в препаративні форми за допомогою загальноприйнятого методу з використанням одного або декількох фізіологічно прийнятних носіїв, розріджувачів, ексципієнтів або допоміжних речовин, які полегшують обробку білків, з одержанням препаратів, які можна застосовувати в фармацевтичних цілях. Відповідна форма залежить від вибраного шляху введення.

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, можна включати в композиції у вигляді вільної кислоти або вільної основи, в нейтральній формі або в формі солі. Фармацевтично прийнятні солі являють собою солі, які практично зберігають біологічну активність вільної кислоти або вільної основи. Вони включають кислотно-адитивні солі, наприклад, солі, утворені з вільними аміногрупами білкової композиції, або утворені з

неорганічними кислотами, такими, наприклад, як соляна або фосфорна кислота, або такими органічними кислотами, як оцтова, щавлева, винна або мигдальна кислота. Солі, утворені з вільною карбоксильною групою, можна одержувати також з неорганічних основ, таких, наприклад, як гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза; або таких органічних основ, як ізопропіламін, триметиламін, гістидин або прокаїн. Фармацевтичні солі мають тенденцію до більш високої розчинності в водних і інших протонних розчинниках у порівнянні з відповідними формами у вигляді вільних основ.

Способи і композиції для терапевтичного застосування

Будь-яку з біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, представлених в даному описі, можна застосовувати в терапевтичних способах. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, можна використовувати як імунотерапевтичні агенти, наприклад, при лікуванні різних видів раку.

Для застосування в терапевтичних методах біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, можна включати в склад препаративних форм, дозувати і вводити відповідно до належної клінічної практики. Фактори, що розглядаються в цьому контексті, включають конкретне порушення, що підлягає лікуванню, конкретного ссавця, що підлягає лікуванню, клінічний стан індивідуального пацієнта, причину захворювання, ділянку введення агента, метод введення, схему введення і інші фактори, відомі практикуючим медикам.

Одним з об'єктів винаходу є біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, призначені для застосування як лікарський засіб. Наступними об'єктами винаходу є біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, призначені для застосування при лікуванні захворювання. Деякими варіантами здійснення винаходу є біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропоновані у винаході, призначені для застосування в способі лікування. Одним з варіантів здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, представлена в даному описі, призначена для застосування при лікуванні захворювання у індивідуума, який потребує цього. Деякими варіантами здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, призначена для застосування в способі лікування індивідуума, який має захворювання, який полягає в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. В деяких варіантах здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості принаймні один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, протираковий засіб, якщо захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою рак. Додатковими варіантами здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, представлена в даному описі, призначена для застосування з метою індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини. Деякими варіантами здійснення винаходу є біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, призначена для застосування в способі індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини, у індивідуума, який полягає в тому, що вводять індивідууму в ефективній кількості біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, для індукції лізису клітини-мішені. "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу являє собою ссавця, переважно людину.

Наступним об'єктом винаходу є застосування біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході, для виробництва або приготування лікарського засобу. В одному з варіантів здійснення винаходу лікарський засіб призначений для лікування захворювання у індивідуума, який потребує цього. В іншому варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювання, який полягає в тому, що вводять індивідууму, який має захворювання, в терапевтично ефективній кількості лікарський засіб. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення. В конкретному варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості принаймні один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, протираковий засіб, якщо захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою рак. В іншому варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини. В наступному варіанті здійснення винаходу лікарський засіб призначений для застосування в способі індукції лізису клітини-мішені, зокрема пухлинної клітини, у індивідуума, який полягає в тому, що

вводять індивідууму в ефективній кількості лікарський засіб для індукції лізису клітини-мішені. "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу може являти собою ссавця, переважно людину.

Наступним об'єктом винаходу є спосіб лікування захворювання. В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб полягає в тому, що вводять індивідууму, що має зазначене захворювання, в терапевтично ефективній кількості біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході. В одному з варіантів здійснення винаходу зазначеному індивідууму вводять композицію, яка містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, в фармацевтично прийнятній формі. В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення. В кращому варіанті здійснення винаходу захворювання являє собою рак. В деяких варіантах здійснення винаходу спосіб полягає також в тому, що вводять індивідууму в терапевтично ефективній кількості принаймні один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, протираковий засіб, якщо захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою рак. "Індивідуум" в контексті будь-якого з зазначених вище варіантів здійснення винаходу може являти собою ссавця, переважно людину.

Наступним об'єктом винаходу є спосіб індукції лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини. В одному з варіантів здійснення винаходу спосіб полягає в тому, що приводять у контакт клітину-мішень з біспецифічною антигензв'язувальною молекулою, яка активує Т-клітини, пропонованою у винаході, за присутності Т-клітини, зокрема, цитотоксичної Т-клітини. Іншим об'єктом винаходу є спосіб індукції лізису клітини-мішені, зокрема, пухлинної клітини. В одному з зазначених варіантів здійснення винаходу спосіб полягає в тому, що вводять індивідууму в ефективній кількості біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, для індукції лізису клітини-мішені. В одному з варіантів здійснення винаходу "індивідуум" являє собою людину.

В деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою проліферативне порушення, насамперед рак. Прикладами раку є (але, не обмежуючись тільки ними) рак сечового міхура, рак головного мозку, рак голови і шиї, рак підшлункової залози, рак легені, рак молочної залози, рак яєчника, рак матки, рак шийки матки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак ободової кишки, колоректальний рак, ректальний рак, рак шлунку, рак передміхурової залози, рак крові, рак шкіри, плоскоклітинна карцинома, рак кістки і рак нирки. Інші порушення клітинної проліферації, які можна лікувати з використанням біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої в даному винаході, включають (але, не обмежуючись тільки ними) неоплазми, локалізовані в: животі, кістці, молочній залозі, травній системі, печінці, підшлунковій залозі, очеревині, ендокринних залозах (надниркова, парашитовидна залоза, гіпофіз, яєчка, яєчник, тимус, щитовидна залоза), оці, голові та шиї, нервовій системі (центральної і периферичній), лімфатичній системі, тазовій ділянці, шкірі, м'якій тканині, селезінці, грудному відділі і сечостатевої системі. Також під обсяг винаходу підпадають передракові стани або ушкодження і метастази раку. В деяких варіантах здійснення винаходу рак вибирають з групи, що включає нирковоклітинний рак, рак шкіри, рак легені, колоректальний рак, рак молочної залози, рак головного мозку, рак голови і шиї. Спеціалісту в даній галузі повинно бути очевидно, що у багатьох випадках біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, не може забезпечувати зцілення, а може тільки здійснювати часткову сприятливу дію. В деяких варіантах здійснення винаходу фізіологічні зміни, що характеризуються деякою сприятливою дією, розглядаються також як терапевтично цінні. Таким чином, в деяких варіантах здійснення винаходу кількість біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, яка забезпечує фізіологічну зміну, розглядається як "ефективна кількість" або "терапевтично ефективна кількість". Суб'єкт, пацієнт або індивідуум, що потребує лікування, являє собою, як правило, ссавця, більш конкретно людину.

В деяких варіантах здійснення винаходу біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, вводять в ефективній кількості в клітину. В інших варіантах здійснення винаходу біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропоновану у винаході, вводять в терапевтично ефективній кількості індивідууму для лікування хвороби.

Для попередження або лікування захворювання відповідна доза біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонованої у винаході (при її застосуванні індивідуально або в поєднанні з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами), повинна залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, шляху введення, маси тіла пацієнта, типу біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка

активує Т-клітини, серйозності і перебігу захворювання, від того, чи вводять біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, в превентивних або терапевтичних цілях, попередніх або здійснюваних одночасно терапевтичних втручань, історії хвороби пацієнта і відповіді на біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, і приписів лікуючого лікаря. Практикуючий спеціаліст, відповідальний за введення, в будь-якому випадку, повинен визначати концентрацію діючої(их) речовини(н) в композиції і відповідну(і) дозу(и) для індивідуального пацієнта. Різні схеми введення доз включають (але, не обмежуючись тільки ними) однократне введення або декілька введень в різні моменти часу, болюсне введення і пульсуючу інфузію.

Біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, можна вводити пацієнту у вигляді однієї обробки або серій обробок. Залежно від типу і серйозності захворювання можлива початкова доза біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, для введення пацієнту, наприклад, з використанням одного або декількох індивідуальних введень або за допомогою безперервної інфузії, може становити приблизно від 1 мкг/кг до 15 мкг/кг (наприклад, 0,1-10 мкг/кг). Типова добова доза може становити від приблизно 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше залежно від відзначених вище факторів. Для повторних введень протягом декількох днів або більш тривалого періоду залежно від стану, лікування, як правило, повинно тривати до досягнення необхідного пригнічення наявних симптомів захворювання. Як приклад, доза біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, може становити від приблизно 0,005 до приблизно 10 мкг/кг. В іншому прикладі (але, не обмежуючись тільки зазначеним) доза на одне введення може становити від приблизно 1, приблизно 5, приблизно 10, приблизно 50, приблизно 100, приблизно 200, приблизно 350, приблизно 500 мкг/кг маси тіла, приблизно 1, приблизно 5, приблизно 10, приблизно 50, приблизно 100, приблизно 200, приблизно 350, приблизно 500 до приблизно 1000 мкг/кг маси тіла або більше, і перебувати в будь-якому зазначеному діапазоні. Як приклади (але, не обмежуючись тільки ними) зазначеного діапазону значень, можна вводити від приблизно 5 до приблизно 100 мкг/кг маси тіла, від приблизно 5 мкг/кг маси тіла до приблизно 500 мкг/кг маси тіла і т.д. з урахуванням зазначених вище рівнів доз. Так, пацієнту можна вводити одну або декілька доз, що становлять приблизно 0,5, 2,0, 5,0 або 10 мкг/кг (або будь-яку їх комбінацію). Зазначені дози можна вводити переривчасто, наприклад, кожний тиждень або кожні три тижні (наприклад, таким чином, щоби пацієнт отримував від приблизно двох до приблизно двадцяти або, наприклад, приблизно шість доз біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини). Можна вводити початкову більш високу ударну дозу, після якої застосовувати одну або декілька більш низьких доз. Однак можна використовувати інші схеми введення доз. Успіх такої терапії легко оцінювати за допомогою загальноприйнятих методик і аналізів.

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, як правило, слід застосовувати в кількості, ефективній для досягнення поставленої мети. При застосуванні для лікування або попередження хворобливого стану біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, або їх фармацевтичні композиції, вводять або застосовують в терапевтично ефективній кількості. Визначення терапевтично ефективної кількості знаходиться в компетенції спеціалістів в даній галузі, насамперед в світлі представленого докладного опису винаходу.

Для системного введення терапевтично ефективну дозу можна спочатку визначати за допомогою аналізів *in vitro*, наприклад, аналізів з використанням клітинних культур. Потім дозу можна включати в форму для вивчення на тваринних моделях для досягнення концентрації в кровотоці, яка знаходиться в діапазоні, що включає значення IC_{50} , визначене на клітинній культурі. Зазначену інформацію можна використовувати для більше точного визначення доз, які можна застосовувати на людях.

Початкові дози можна оцінювати також, виходячи з даних, одержаних *in vivo*, наприклад, на тваринних моделях, використовуючи методики, добре відомі в даній галузі. Звичайний спеціаліст в даній галузі легко може оптимізувати застосування на людях на основі даних, одержаних на тваринах.

Рівень доз і інтервал можна регулювати індивідуально для одержання рівнів в плазмі біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, які є достатніми для підтримки терапевтичної дії. Звичайні дози, призначені для введення пацієнту шляхом ін'єкції, становлять від приблизно 0,1 до 50 мкг/кг/день, як правило, від приблизно 0,5 до 1 мкг/кг/день. Для досягнення терапевтично ефективних рівнів в плазмі можна вводити декілька доз кожний день. Рівні в плазмі можна оцінювати, наприклад, за допомогою РХВР.

У випадках місцевого застосування або вибіркового поглинання ефективна місцева концентрація біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини може не

відповідати концентрації в плазмі. Спеціаліст в даній галузі може оптимізувати терапевтично ефективні місцеві дози без надмірних експериментів.

Застосування в терапевтично ефективній дозі біспецифічних антигензв'язувальних молекул, які активують Т-клітини, представлених в даному описі, повинно, як правило, забезпечувати терапевтичну користь, не викликаючи суттєвої токсичності. Токсичність і терапевтичну ефективність біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних процедур на культурах клітин або експериментальних тваринах. Аналізи на клітинних культурах або досліди на тваринах можна застосовувати для визначення значень LD₅₀ (доза, смертельна для 50 % популяції) і ED₅₀ (доза, терапевтично ефективна для 50 % популяції). Співвідношення доз, що характеризують токсичні і терапевтичні дії, позначають як терапевтичний індекс, який можна виражати у вигляді співвідношення LD₅₀/ED₅₀. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, що мають високі терапевтичні індекси, є кращими. В одному з варіантів здійснення винаходу біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, пропонується в даному винаході, характеризується високим терапевтичним індексом. Дані, отримані в аналізах з використанням клітинних культур і в дослідях на тваринах, можна застосовувати для визначення діапазону доз, які можна застосовувати на людях. Доза лежить переважно в діапазоні концентрацій в кровотоці, які включають ED₅₀, що мають невисоку токсичність або зовсім не мають токсичність. Доза може варіюватися залежно від різних факторів, наприклад, від застосовуваної лікарської форми, застосовуваного шляху введення, стану індивідуума і т.п. Точну препаративну форму, шлях введення і дозу може вибирати індивідуально лікар залежно від стану пацієнта (див., наприклад, Fingl і ін. в: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, гл. 1, 1975, с. 1, публікація повністю включена у даний опис як посилання).

Лікуючому лікарю пацієнтів, яким вводять біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, повинно бути очевидно, як і коли закінчувати, переривати або регулювати введення через токсичність, дисфункції органів і т.п. І, навпаки, лікуючому лікарю повинно бути очевидно, як регулювати лікування в бік застосування більше високих доз, якщо клінічна відповідь є неадекватною (запобігаючи токсичності). Величина дози, що вводиться при лікуванні порушення, яке являє інтерес, повинна варіюватися залежно від серйозності стану, що підлягає лікуванню, шляху введення і т.п. Серйозність стану можна, наприклад, оцінювати серед іншого за допомогою стандартних прогностичних методів оцінювання. Крім того, доза і передбачувана частота введення дози повинні також варіюватися залежно від віку, маси тіла і відповіді індивідуального пацієнта.

Інші засоби і варіанти лікування

Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, при лікуванні можна вводити в поєднанні з одним або декількома іншими засобами. Наприклад, біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропонувану у винаході, можна вводити спільно принаймні з одним додатковим терапевтичним засобом. Поняття "терапевтичний засіб" включає будь-який засіб, який вводять для лікування симптому або захворювання у індивідуума, який потребує такого лікування. Зазначений додатковий терапевтичний засіб може являти собою будь-яку діючу речовину, яку можна застосовувати при конкретному показанні, що підлягає лікуванню, переважно з додатковими видами активності, які не здійснюють негативного впливу один на одного. В деяких варіантах здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб являє собою імуномодулятор, цитостатичний засіб, інгібітор клітинної адгезії, цитотоксичний засіб, активатор клітинного апоптозу або засіб, що підвищує чутливість клітин до індукторів апоптозу. В конкретному варіанті здійснення винаходу додатковий терапевтичний засіб являє собою протираковий засіб, наприклад, агент, що руйнує мікротрубочки, антиметаболіт, інгібітор топоізомерази, інтеркалятор ДНК, алкілюючий агент, засіб гормональної терапії, інгібітор кіназ, антагоніст рецептора, активатор апоптозу пухлинних клітин або антиангіогенний засіб.

Зазначені інші засоби можуть бути присутніми в комбінації в кількостях, ефективних для зазначених цілей. Ефективна кількість зазначених інших засобів залежить від кількості застосовуваної біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, типу порушення або лікування, і інших зазначених вище факторів. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, як правило, застосовують в таких же дозах і з використанням зазначених в даному описі шляхів введення, або в дозах, що становлять приблизно від 1 до 99 % від зазначених в даному описі доз, або в будь-якої дозі і з використанням будь-якого шляху введення, які відповідно до емпіричних/клінічних даних розглядаються як прийнятні.

Відзначені вище комбіновані терапії передбачають спільне введення (коли два або більшу кількість терапевтичних засобів включають в одну і ту ж або в окремі композиції) і роздільне

введення, в цьому випадку введення біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, пропонуваної у винаході, можна здійснювати до, одночасно і/або після введення додаткового терапевтичного засобу і/або ад'юванта. Біспецифічні антигензв'язувальні молекули, які активують Т-клітини, пропонувані у винаході, можна застосовувати також в поєднанні з променевою терапією.

Вироби

Іншим об'єктом винаходу є виріб, який містить продукти, застосовувані для лікування, попередження і/або діагностування зазначених вище порушень. Виріб являє собою контейнер і етикетку або листівку-вкладку в упаковку, яка розміщена на контейнері або додається до нього. Прийнятними контейнерами є, наприклад банки, пляшечки, шприці, пакети для внутрішньовенного (IV) розчину і т.д. Контейнери можна виготовляти з різних матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер містить композицію, яка сама по собі або в поєднанні з іншою композицією, що є ефективною для лікування, попередження і/або діагностування стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або пляшечку, забезпечений(у) пробкою, яку можна проколувати за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Принаймні одна діюча речовина в композиції являє собою біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропонувану у винаході. На етикетці або листівці-вкладці в упаковку зазначено, що композицію застосовують для лікування вибраного стану. Крім того, виріб може включати (а) перший контейнер з композицією, що міститься в ньому, де композиція містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, пропонувану у винаході; і (б) другий контейнер з композицією, що міститься в ньому, де композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний засіб. Відповідно до цього варіанту здійснення винаходу виріб може містити листівку-вкладку в упаковку, яка містить інформацію про те, що композиції можна використовувати для лікування конкретного стану. В альтернативному або додатковому варіанті виріб може додатково включати другий (або третій) контейнер з фармацевтично прийнятним буфером, таким як бактеріостатична вода для ін'єкцій (БСВІ), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Крім того, він може включати інші матеріали, необхідні з комерційної точки зору і з точки зору споживача, зокрема, інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприці.

Приклади

Нижче представлені приклади способів і композицій, пропонуваних у винаході. Як повинно бути очевидно, можна втілювати на практиці різні інші варіанти здійснення винаходу у цілому з урахуванням представленого вище опису винаходу.

Загальні методи

Методи рекомбінантної ДНК

Для маніпуляцій з ДНК використовували стандартні методи, описані у Sambrook J. і ін., Molecular cloning: A laboratory manual; в-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенти для молекулярної біології застосовували відповідно до інструкцій виробників. Загальну інформацію, що стосується нуклеотидних послідовностей легких і важких ланцюгів людських імуноглобулінів, див. у: Kabat E.A. і ін., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-те вид., в-во NIH, публікація N 91-3242, 1991.

Секвенування ДНК

Послідовності ДНК визначали шляхом секвенування двох ланцюгів.

Синтез генів

Необхідні сегменти генів або створювали за допомогою ПЛР з використанням відповідних матриць, або синтезували на фірмі Geneart AG (Регенсбург, Німеччина) з синтетичних олігонуклеотидів і ПЛР-продуктів за допомогою автоматичного синтезу генів. В тих випадках, коли точна генна послідовність не була доступною, створювали олігонуклеотидні праймери на основі послідовностей найближчих гомологів і гени виділяли за допомогою ЗТ-ПЛР з РНК, одержаної з відповідної тканини. Сегменти генів, фланковані одиничними сайтами, що розпізнаються рестрикційними ендонуклеазами, клонували в стандартних клонуючих/секвенуючих векторах. Плазмідну ДНК очищали з трансформованих бактерій і визначали концентрацію за допомогою УФ-спектроскопії. Послідовність ДНК субклонуваних фрагментів генів підтверджували ДНК-секвенуванням. Створювали сегменти генів з необхідними сайтами рестрикції, що дозволяють субклонувати їх в відповідних експресійних векторах. Всі конструції створювали з 5'-кінцевою послідовністю ДНК, що кодує лідерний пептид, який спрямовує секрецію білків в еукаріотичних клітинах.

Приклад 1

Одержання біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини (ТСВ), з модифікаціями зарядів і

без них (анти-CD20 /анти-CD3)

В цьому прикладі описано одержання наступних молекул, схематичні ілюстрації яких представлені на фіг. 2:

А. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (CH1/CL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2А, SEQ ID NO: 14-17),

Б. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальних компонентах) (фіг. 2Б, SEQ ID NO: 18-21),

В. "2+1 IgG CrossFab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальних компонентах) (фіг. 2В, SEQ ID NO: 32, 19-21),

Г. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (VH/VL-обмін CD3-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2Г, SEQ ID NO: 33, 15, 17, 21),

Г. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (VH-CH1/VL-CL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2Г', SEQ ID NO: 34, 15, 17, 35),

Д. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD20-зв'язувальних компонентах, модифікація зарядів в CD3-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2Д, SEQ ID NO: 36-39),

Е. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів і DDKK-мутацією в Fc-області (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікації зарядів в CD20-зв'язувальних компонентах) (фіг. 2Е, SEQ ID NO: 40, 41, 20, 21),

Є. "1+1 CrossMab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2Є, SEQ ID NO: 42, 43, 20, 21),

Ж. "1+1 CrossMab" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальному компоненті, другий CD20-зв'язувальний компонент) (фіг. 2Ж, SEQ ID NO: 43-45, 21),

З. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів 213Е, 123R (VH/VL-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті, модифікація зарядів в CD20-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2З, SEQ ID NO: 69-71, 21),

И. "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (VH/VL-обмін і модифікація зарядів в CD3-зв'язувальному компоненті) (фіг. 2И, SEQ ID NO: 15, 17, 72, 73).

Послідовності ДНК варіабельних областей важких і легких ланцюгів субклонували в рамці зчитування або з константною областю важкого ланцюга, або з константною областю легкого ланцюга, попередньо вбудованою в відповідний реціпієнтний експресійний вектор для клітин ссавців. Експресія антитіла перебувала під контролем промотора MPSV, і вектор ніс синтетичну сигнальну полі(А)-послідовність на 3'-кінці кожної CDS. Крім того, кожний вектор містив OriP-послідовність EBV.

Молекули одержували шляхом спільної трансфекції клітин, що ростуть в суспензії, експресійними векторами для клітин ссавців, використовуючи поліетиленімін (ПЕІ). Клітини трансфектували відповідними експресійними векторами у співвідношенні 1:2:1:1 (А: "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-VH-CL-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VL-CL)": "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VL-CH1)"; Б, Г, Е, З, И: "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-VL-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VL-CL)": "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VH-CL)"; В: "вектор важкого ланцюга (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VL-CL)": "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VH-CL)"; Г': "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-VL-CL-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VL-CL)": "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VH-CH1)"; Д: вектор важкого ланцюга (VL-CH1-VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VH-CL)": "вектор важкого ланцюга (VL-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VH-CH1)") або у співвідношенні 1:1:1:1 (Є, Ж: "вектор важкого ланцюга (VL-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VL-CL)": "вектор важкого ланцюга (VH-CH1-CH2-CH3)": "вектор легкого ланцюга (VH-CL)").

Для трансфекції клітини НЕК293 EBNA культивували в суспензійному безсироватковому культуральному середовищі Excell, що містить 6мМ L-глутамін і 250 мг/л G418. Для одержання в 600-мілілітрових колбах (біореакторах) TubeSpin (максимальний робочий об'єм 400 мл) 600 млн клітин НЕК293 EBNA висівали за 24 год. до трансфекції. Для трансфекції клітини центрифугували протягом 5 хв при 210 × g і супернатант заміняли на 20 мл попередньо нагрітого середовища CD CHO. Експресійні вектори змішували в 20 мл середовища CD CHO до одержання кінцевої кількості ДНК, що становить 400 мкг. Після добавлення 1080 мкл розчину ПЕІ (2,7 мкг/мл) суміш інтенсивно перемішували протягом 15 с і потім інкубували протягом 10 хв

при кімнатній температурі. Потім клітини змішували з розчином ДНК/PEI, переносили в 600-мілілітрову колбу TubeSpin і інкубували протягом 3 год. при 37 °C в інкубаторі в атмосфері, що містить 5 % CO₂. Після інкубації добавляли 360 мл середовища Excell+6mM L-глутамін + 5 г/л Персоу+1,0mM середовище VPA і клітини культивували протягом 24 год. Через 1 день після трансфекції добавляли 7 % Feed 1 (фірма Lonza). Після культивування протягом 7 днів супернатант збирали для очистки шляхом центрифугування протягом 20-30 хв при 3600 × g (центрифуга Sigma 8K), розчин стерилізували фільтрацією (0,22мМ-фільтр) і добавляли азид натрію в кінцевій концентрації 0,01 % (мас./об.). Розчин витримували при 4 °C.

Концентрацію конструкцій в культуральному середовищі визначали за допомогою білока-RXBP. В основу розділення покладено зв'язування молекул, які містять Fc, з білком А при рН 8,0 і здійснення стадії елюції при рН 2,5. Застосовували дві рухомі фази. Вони включали буфери на основі Трис (10mM) - гліцину (50mM) - NaCl (100mM), ідентичні за винятком того, що їх регулювали для одержання різних величин рН (8 і 2,5). Основою колонки була передколонка Upchurch 2×20 мм з внутрішнім об'ємом ~63 мкл, упакована POROS 20A. По 100 мкл кожного зразка ін'єктували на врівноважений матеріал зі швидкістю потоку 0,5 мл/хв. Через 0,67 хв зразок елюювали, використовуючи рН на цій стадії 2,5. Для кількісного оцінювання абсорбцію визначали при довжині хвилі 280 нм і проводили розрахунок, використовуючи стандартну криву, для одержання якої використовували людський IgG1 в діапазоні концентрацій від 16 до 166 мг/л.

Секретований білок очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії, застосовуючи афінну хроматографію на білку А з наступною стадією гель-фільтрації.

При здійсненні афінної хроматографії супернатант завантажували в колонку HiTrap ProteinA HP (CV=5 мл, фірма GE Healthcare), врівноважену 25 мл буфера, що містить 20mM фосфат натрію, 20mM цитрат натрію, рН 7,5. Незв'язаний білок видаляли промиванням, використовуючи об'єм, кратний принаймні 10 об'ємам колонки, буфера, що містить 20mM фосфат натрію, 20mM цитрат натрію, 0,5M хлорид натрію, рН 7,5, з наступною додатковою стадією промивання, для якої використовували об'єм, кратний 6 об'ємам колонки, буфера, що містить 10mM фосфат натрію, 20mM цитрат натрію, 0,5M хлорид натрію, рН 5,45. Потім колонку промивали, використовуючи 20 мл буфера, що містить 10mM MES, 100mM хлорид натрію, рН 5,0, і необхідний білок елюювали, застосовуючи в об'ємі, кратному 6 об'ємам колонки, 20mM цитрат натрію, 100mM хлорид натрію, 100mM гліцин, рН 3,0. Білковий розчин нейтралізували, добавляючи 1/10 0,5M фосфату натрію. Необхідний білок концентрували перед завантаженням в колонку HiLoad Superdex 200 (фірма GE Healthcare), врівноважену буфером, що містить 20mM гістидин, 140mM хлорид натрію, 0,01 % Твін-20, рН 6,0. Молекулу А слід очищати, використовуючи додаткову стадію препаративної гель-фільтрації (SEC) для досягнення кінцевого вмісту мономера, що становить 100 %. Для цієї мети фракції з високим вмістом мономера після першої стадії гель-фільтрації об'єднували, концентрували і знову завантажували в колонку HiLoad Superdex 200 (фірма GE Healthcare). Зазначена додаткова стадія очистки не була необхідною для інших молекул (залежно від профілю побічного продукту, однак об'єднані фракції і, отже, вихід після першої стадії гель-фільтрації, були різними для зазначених молекул).

Чистоту і молекулярну масу молекул аналізували після першої стадії очистки (афінна хроматографія на білку А) за допомогою ДСН-ПААГ за відсутності відновника і здійснювали забарвлення кумасі (SimpleBlue™ SafeStain, фірма Invitrogen). Гелеву систему NuPAGE® Pre-Cast (фірма Invitrogen, США) застосовували відповідно до інструкції виробника (4-12 % Трис-ацетатні гелі або 4-12 % Біс-Трис).

Концентрацію білка в очищених білкових зразках визначали шляхом вимірювання оптичної густини (ОГ) при 280 нм, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності.

Чистоту і молекулярну масу молекул після кінцевої стадії очистки аналізували за допомогою KE-ДСН-аналізів за присутності відновника і без нього. Застосовували систему Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Lifescience) відповідно до інструкцій виробника. Для аналізів використовували 2 мкг зразка.

Вміст агрегатів в зразках антитіл аналізували, використовуючи колонку для аналітичної гель-фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh) в рухомому буфері, що містить 25mM K₂HPO₄, 125mM NaCl, 200mM моногідрохлорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.) NaN₃, рН 6,7, при 25°C.

Всі молекули одержували і очищали за допомогою одного і того ж методу (за винятком молекули А, яку піддавали, як зазначено вище, додатково стадії SEC).

Для молекули А характерний високий вміст агрегатів після першої стадії препаративної гель-фільтрації. Вміст агрегатів після зазначеної стадії очистки не піддавався визначенню, оскільки на базовому рівні не вдавалося розділяти високомолекулярні домішки і мономерну фракцію. Для одержання 100 %-вого мономерного продукту була необхідна додаткова стадія препаративної гель-фільтрації. Молекула Б являла собою 100 %-вий мономер після першої стадії препаративної гель-фільтрації.

Концентрація в супернатанті була більш високою для молекули А, але кінцевий вихід був (через високий вміст агрегатів) в 2,3 рази нижче, ніж для молекули Б (таблиця 2).

Кінцева чистота за даними КЕ-ДСН-аналізів виявилась більш високою у молекули Б, ніж у молекули А (таблиця 3, фіг. 3А і Б). На фіг. 3Г і 3И продемонстровані хроматограми, одержані на стадії очистки за допомогою SEC (препаративна SEC), на яких молекула А має більш широкий пік у порівнянні з молекулою Б, що свідчить про те, що препарат молекули А, завантажений в колонку для SEC, не був гомогенним, а препарат молекули Б був у цілому мономерним.

Молекулу В можна одержувати з високим титром, але у порівнянні з молекулою Б її кінцевий вихід виявився більш низьким через високий вміст кінцевих продуктів, які не вдалося повністю видалити за допомогою застосовуваних хроматографічних методів (таблиця 2; таблиця 3; фіг. 3Б і 3З, і фіг. 3В і 3И). Як показано на фіг. 3Б і 3И, ДСН-ПААГ-аналіз після стадії очистки на білку А продемонстрував відсутність побічних продуктів для молекули Б, в той час як препарат молекули В містив деякі побічні продукти, що відповідали удаваній молекулярній масі 100 кДа.

Молекула Г відрізнялася від молекули Б тільки відсутністю заряджених залишків в анти-CD20 Fab-фрагментах. Зазначену молекулу можна одержувати також короткочасно з високим титром, але, як це вже було описано для молекули В, кінцева чистота, встановлена за допомогою аналітичної SEC (98 % мономера для молекули Г і 100 % мономера для молекули Б), і вихід виявилися більш низькими, ніж для молекули Б, через високий вміст побічних продуктів (таблиця 2; таблиця 3; фіг. 3Б і 3З, і фіг. 3Г і 3И). Як показано на фіг. 3З і 3И, за допомогою ДСН-ПААГ-аналізу після стадії очистки на білку А не виявлено жодних побічних продуктів для молекули Б, в той час як препарат молекули Г містив деякі побічні продукти, що відповідали удаваній молекулярній масі 66 кДа і 40 кДа.

На фіг. 3И і 3К показані хроматограми, одержані після стадії SEC-очистки (препаративна SEC), на яких молекула Г має більш широкий пік у порівнянні з молекулою Б, що свідчить про те, що препарат молекули Г, завантажений в колонку для SEC, не був гомогенним, а препарат молекули Б був у цілому мономерним.

Крім того, титр після одержання молекули Г був високим, але кінцевий продукт все ще включав низькомолекулярні домішки, що продемонстровано за допомогою аналітичної SEC і капілярного електрофорезу (таблиця 2; таблиця 3; фіг. 3Г).

На відміну від молекули Б, молекула Д має VH-VL-обмін на Fab-фрагменті, що зв'язуються з пухлиною-мішенню, при цьому модифікації зарядів інтродуковані в анти-CD3 Fab. Зазначену молекулу можна одержувати також з високими титрами, але кінцевий вихід був низьким через побічні продукти. Для анти-CD20/анти-CD3 TCB з позицій одержання і очистки кращим виявився формат з модифікаціями зарядів в анти-CD20 Fab.

Молекула Е являє собою молекулу з модифікаціями зарядів в Fc-області ("DD" = K392D; K409D в одній з субодиниць Fc-домену, "KK" = D356K; D399K в іншій субодиниці Fc-домену (EU-нумерація)), замість мутації типу "knob into hole". Утворення біспецифічних молекул посилювали шляхом інтродукції двох залишків аспарагіну в один важкий ланцюг і двох залишків лізину в другий важкий ланцюг (фіг. 2Е). Зазначену молекулу можна одержувати з високим титром, але кінцевий продукт все ще містить деякі високомолекулярні і низькомолекулярні домішки, що продемонстровано за допомогою аналітичної SEC і капілярного електрофорезу (таблиця 2; таблиця 3), в той час як побічні продукти можна повністю видаляти у випадку такої ж молекули, що несе мутацію "knob into hole" (молекула Б).

Для молекули Ж, яка відрізняється від молекули Є своїм CD20-зв'язуючим компонентом, встановлено більш високий вміст агрегатів після кінцевої препаративної гель-фільтрації у порівнянні з молекулою Є. За даними КЕ-ДСН-аналізів кінцева чистота виявилась більш високою для молекули Є, ніж для молекули Ж (таблиця 3; фіг. 3Є і 3Ж). Крім того, вихід молекули Є виявився на 40 % вище, ніж вихід молекули Ж (таблиця 2). Цей результат продемонстрував, що якість молекули залежить також від антитіла, застосовуваного в біспецифічному форматі, що активує Т-клітини.

При одержанні молекули З і молекули И мали високі вихідні титри, що приводило до високого виходу. Однак кінцевий вихід становив близько 20 % для обох молекул, що було набагато менше виходу 48 %, що досягається для молекули Б (таблиця 2). Обидві молекули мали подібну кінцеву якість з вмістом мономера >99 % (таблиця 2). Чистота при використанні

КЕ-ДСН в невідновних умовах виявилась краще для молекули 3 (в якій були відсутні модифікації зарядів в положенні 124 CL-домену і положенні 147 CH1-домену) і становила близько 99 % у порівнянні з молекулою И (яка мала модифікації зарядів і VL-VH-обмін в CD3-зв'язувальному компоненті), чистота якої становила 90 % (таблиця 3, фіг. 3Й і 3К). Для молекули 3 характерно деяке осадження в процесі стадії концентрування після стадії афінної хроматографії. Молекула И мала модифікації зарядів в CD3-зв'язувальному CrossFab, а не в CD20-зв'язувальних Fab. Це здійснювало вплив на кінцеву якість, що продемонстровано за допомогою КЕ-ДСН (таблиця 3, фіг. 3К). Різниця в якості виявилась найбільш значною після першої стадії очистки при використанні методу ДСН-ПААГ (фіг. 3Л, 3М). Молекула 3 містила більше побічних продуктів з молекулярною масою 150 кДа і 70 кДа (половинні молекули і конструкції, ймовірно без легких ланцюгів), ніж молекула 3. Обидві молекули мали таку ж термостабільність, що і молекула Б (таблиця 4).

Для анти-CD20/анти-CD3 TCB "інвертована" версія з модифікаціями зарядів на анти-CD20 Fab (молекула Б) являє собою формат, який можна одержувати з найбільш високим виходом і кінцевою якістю.

Таблиця 2

Узагальнення даних про виробництво і очистку анти-CD20 /анти-CD3 TCB-молекул з модифікаціями зарядів і без модифікацій зарядів

Молекула	Титр (мг/л)	Вихід [%]	Вихід (мг/л)	Аналітична SEC (HMW/мономер/ LMW) [%]	Приблизна чистота, визначена за допомогою PX-МС [%]
А	16,7	7,2	1,2	0/100/0 *	85-90 *
Б	5,5	48,2	2,8	0/100/0	93
В	25	12,9	3,24	4/93/3	Nd
Г	55	9,8	5,42	2/98/0	Nd
Г	30,5	3,3	0,99	0/96,3/3,7	Nd
Д	57	11,8	6,43	3,4/96,6/0	Nd
Е	56	21	11,8	3,75/92,3/3,43	Nd
Є	29	9,2	2,66	2/98/0	Nd
Ж	52,5	5,8	3,05	2,7/95,3/2	Nd
З	77	18	17,4	0,7/99,3/0	Nd
И	71,5	21,8	15,5	0/99,7/0,3	Nd

* кінцевий продукт після двох стадій SEC

Таблиця 3

Результати КЕ-ДСН-аналізів (невідновні умови) анти-CD20 /анти-CD3 TCB-молекул з модифікаціями зарядів і без модифікацій зарядів

Молекула	Пік, №	Розмір [кДа]	Чистота [%]
А	1	34,13	0,49
	2	55,10	0,58
	3	58,89	0,97
	4	152,30	1,76
	5	165,95	2,25
	6	177,64	7,75
	7	186,15	14,06
	8	194,17	18,37
	9	201,68	53,77
Б	1	160,09	0,57
	2	180,70	1,62
	3	194,42	97,81
В	1	131,12	0,82
	2	141,45	3,45
	3	182,86	2,39

Таблиця 3

Результати КЕ-ДСН-аналізів (невідновні умови) анти-CD20 /анти-CD3 ТСВ-молекул з модифікаціями зарядів і без модифікацій зарядів

Молекула	Пік, №	Розмір [кДа]	Чистота [%]
	4	192,1	13,5
	5	198,13	79,84
Г	1	207,04	100
Г	1	176,36	0,67
	2	196,54	14,36
	3	209,22	84,97
Д	1	30,41	0,55
	2	65,04	1,33
	3	198,80	2,05
	4	203,10	7,94
	5	213,93	88,12
Е	1	96,50	1,67
	2	208,46	96,77
	3	216,11	1,55
Є	1	131,98	1,13
	2	140,64	1,96
	3	153,02	92,24
	4	161,24	4,67
Ж	1	55,75	1,88
	2	158,62	50,78
	3	178,6	46,14
	4	218,64	1,2
З	1	186,5	1,4
	2	198,2	98,6
И	1	164,7	4
	2	182,4	6
	3	200,1	90

Підтвердження молекулярної маси за допомогою РХ-МС-аналізів
Деглікозилювання

- 5 Для підтвердження гомогенності препаратів молекул кінцевий білковий розчин аналізували за допомогою РХ-МС. Для усунення гетерогенності, пов'язаної з вуглеводами, конструкції обробляли PNGазоюF. Для цієї мети значення рН білкової розчину доводили до рН 7,0, добавляючи 2 мкл 2М Трис до 20 мкг білка з концентрацією 0,5 мг/мл. Добавляли 0,8 мкг PNGазиF і інкубували протягом 12 год. при 37 °С.

РХ-МС-аналіз - онлайн виявлення

- 10 Для здійснення методу РХ-МС застосовували пристрій Agilent HPLC 1200, сполучений з мас-спектрометром TOF 6441 (фірма Agilent). Хроматографічне розділення здійснювали на полістирольній колонці Macherey Nagel; RP1000-8 (розмір частинок 8 мкм, 4,6 × 250 мм; каталожний № 719510). Елюент А являв собою 5 % ацетонітрилу і 0,05 об. % мурашиної кислоти в воді, елюент Б являв собою 95 % ацетонітрилу, 5 % води і 0,05 % мурашиної кислоти.
- 15 Швидкість потоку становила 1 мл/хв, розділення здійснювали при 40 °С і з використанням 6 мкг (15 мкл) білкового зразка, одержаного за допомогою описаної вище обробки.

Час (хв.)	% Б
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Одержаний протягом перших 4 хв елюат відправляли у відходи для попередження забруднення солями мас-спектрометра. Через ESI-джерело пропускали осушуючий газ зі швидкістю 12 л/хв, температура становила 350 °C і тиск в розпилювачі становив 60 фунтів на кв.дюйм. МС-спектри одержували, використовуючи напругу фрагментатора 380 В і діапазон мас від 700 до 3200 m/z в режимі позитивної іонізації. МС-дані отримували, використовуючи програмне забезпечення пристрою, починаючи з 4 хв, до 17 хв.

В препараті молекули А виявлено приблизно 10-15 % молекул з помилково спареними легкими ланцюгами і слідові кількості вільних або зв'язаних легких ланцюгів. В препараті молекули Б виявлені слідові кількості молекул, які містять два легкі ланцюги CD3. Не вдалося виявити домішки, такі як вільні легкі ланцюги або зв'язані легкі ланцюги (таблиця 2).

Визначення термостабільності на основі статичного розсіювання світла

Моніторинг термостабільності проводили на основі статичного розсіювання світла (CPC) і шляхом вимірювання властивості білку флуоресценції у відповідь на піддавання температурному стресу.

30 мкг профільтованого білкового зразка з концентрацією білка 1 мг/мл вносили з дублюванням в пристрій Optim 2 (фірма Avacta Analytical Ltd; Великобританія). Температуру підвищували з 25 до 85 °C зі швидкістю 0,1 C/хв, отримуючи дані про радіус і загальну інтенсивність розсіювання. Для визначення властивості білку флуоресценції використовували для збудження зразка довжину хвилі 295 нм і випромінювання оцінювали при довжині хвилі від 266 до 473 нм.

Термостабільність визначали для всіх молекул, результати представлені в таблиці 4. Температуру агрегації (T_{Agg}) визначали на основі динамічного розсіювання світла і температуру плавлення (T_{M}), виміряну за флуоресценцією білка після застосування температурного градієнта, порівнювали для всіх молекул з T_{Agg} в діапазоні від 54-58 °C і T_{M} в діапазоні від 56 до 60 °C (таблиця 4).

Таблиця 4

Термостабільність анти-CD20/анти-CD3 TCB-молекул з модифікаціями зарядів і без модифікацій зарядів

Молекула	$T_{\text{агрегації}} [^{\circ}\text{C}]$	$T_{\text{M}} [^{\circ}\text{C}]$
А	54,4	55,9
Б	54,3	56,4
В	56	59
Г	56	59
Ґ	56	60
Д	58	60
Е	57	59
Є	55	56
Ж	53	57
З	54	55
И	54	55

Зв'язування з CD3 і CD20 антитіл до CD3/до CD20 у вигляді TCB

Оцінювали зв'язування з CD3 антитіл до CD3 /CD20 у вигляді біспецифічних молекул, які активують Т-клітини (TCB), з модифікаціями зарядів або без них (молекули "А" і "Б", описані вище), застосовуючи клітини Jurkat, що експресують людський CD3. Зв'язування з CD20 визначали, використовуючи клітини Z-138, що експресують людський CD20. Збирали суспензію клітин, промивали однократно ЗФР і визначали життєздатність і густину клітин за допомогою пристрою Vicell. Суспензію клітин ресуспендували з розрахунку 2×10^6 клітин/мл в FACS-буфері. 100 мкл клітинної суспензії застосовували для посіву в 96-лунковий круглодонний планшет. Кожну стадію здійснювали при 4 °C. Планшети центрифугували при $360 \times g$ протягом 5 хв і супернатант видаляли. Приготовляли розведення антитіл в ЗФР/0,1 % БСА. Добавляли в лунки 30 мкл розведених антитіл до CD3/до CD20 у вигляді TCB або FACS-буфера і клітини інкубували протягом 30 хв при 4 °C. Після інкубації добавляли по 120 мкл FACS-буфера на лунку, планшет центрифугували протягом 5 хв при $350 \times g$ і супернатант видаляли. Стадію промивання повторювали один раз. Добавляли по 30 мкл на лунку попередньо розведеного вторинного антитіла, як зазначено на схемі планшета. Планшети інкубували протягом ще 30 хв при 4 °C. Після інкубації добавляли по 120 мкл на лунку FACS-буфера, планшети

центрифугували протягом 5 хв при $350 \times g$ і супернатант видаляли. Стадію промивання повторювали один раз для всіх планшетів, за винятком планшета з клітинами Jurkat, які фіксували безпосередньо після зазначеної однієї стадії промивання. Клітини фіксували, використовуючи 100 мкл на лунку буфера для фіксації фірми BD (фірма BD Biosciences, № 554655) при 4°C протягом 20-30 хв. Клітини ресуспендували, використовуючи 80 мкл/лунку FACS-буфера, для вимірювання FACS за допомогою пристрою BD FACS Cantoll.

Результати зазначеного експерименту представлені на фіг. 4.

Лізіс пухлинних клітин і активація CD4^+ - і CD8^+ -Т-клітин після опосередкованого Т-клітинами цитолізу експресуючих CD20 пухлинних клітин-мішеней, індукowanego антитілами до CD3 /до CD20 у вигляді ТСВ

Опосередкований Т-клітинами цитоліз клітин-мішеней і активацію Т-клітин, індукowaną антитілами до CD3 /до CD20 у вигляді ТСВ з модифікаціями зарядів або без них (молекули "А" і "Б" описані вище) оцінювали на пухлинних клітинах Z-138 і Nalm-6. Людські PBMC застосовували як ефекторні клітини і цитоліз, а також активацію Т-клітин визначали через 22 год. після інкубації з біспецифічним антитілом. У цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали, промивали і висівали з густиною 30000 клітин/лунку в круглодонні 96-лункові планшети. Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) одержували центрифугуванням в градієнті густини Histopaque® свіжої крові здорових донорів. Свіжу кров розводили стерильним 3ФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, №H8889). Після центрифугування ($450 \times g$, 30 хв, кімнатна температура) плазму над інтерфазою, що містить PBMC, відкидали і PBMC переносили в нову фалькеновську пробірку, в яку потім добавляли 50 мл 3ФР. Суміш центрифугували ($400 \times g$, 10 хв, кімнатна температура), супернатант відкидали і дебріс PBMC промивали двічі стерильним 3ФР (стадії центрифугування при $350 \times g$, 10 хв). Здійснювали автоматичний підрахунок (ViCell) одержаної популяції PBMC і витримували у середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biochrom, K0302) в інкубаторі для клітин (37°C , 5 % CO_2) аж до подальшого використання (не більше 24 год.). Для аналізу цитолізу антитіла добавляли в зазначених концентраціях (діапазон від 1000pM до 0,1pM в трьох повторностях). PBMC добавляли до клітин-мішеней в кінцевому співвідношенні Е:Т 6:1. Після інкубації планшети центрифугували при $420 \times g$ протягом 4 хв і переносили з розрахунку 50 мкл/лунку в свіжі 96-лункові плоскодонні планшети для ЛДГ-детекції. ЛДГ-детекцію здійснювали, застосовуючи набір для детекції цитотоксичності (Cytotoxicity Detection Kit) (фірма Roche, № 11644793001) відповідно до інструкцій виробника. Клітини, що залишилися, промивали 3ФР, що містить 0,1 % БСА. Забарвлення для виявлення на поверхні CD8 (APCCy7-антитіло до людського CD8 , фірма Biolegend, № 301016), CD4 (FITC-антитіло до людського CD4 , фірма Biolegend, № 300506), CD69 (BV421-антитіло до людського CD69 , фірма Biolegend, № 310930) і CD25 (PECy7-антитіло до людського CD25 , фірма Biolegend, № 302612) здійснювали відповідно до рекомендацій постачальника. Після витримування протягом 30 хв при 4°C клітини промивали двічі, використовуючи 150 мкл/лунку 3ФР, що містить 0,1 % БСА, і фіксували, використовуючи 100 мкл/лунку 2 % парафторфенілаланіну (PFA). Вимірювання здійснювали за допомогою пристрою BD FACS Cantoll.

Результати цього експерименту представлені на фіг. 5, 6 і 7. Обидві молекули мали порівняну активність стосовно лізису пухлинних клітин і активації Т-клітин.

Виснаження В-клітин і активація CD4^+ - і CD8^+ -Т-клітин після опосередкованого Т-клітинами цитолізу здорових людських В-клітин, індукowanego антитілами до CD3 /до CD20 у вигляді ТСВ, в цільній крові людини

Людську цільну кров здорового донора інкубували з антитілами до CD3 /до CD20 у вигляді ТСВ з модифікаціями зарядів або без них (молекули "А" і "Б", описані вище) в зазначених концентраціях (діапазон від 50000 до 1pM в трьох повторностях). Через 22 год. кров перемішували і 5 мкл відбирали для забарвлення за допомогою 20 мкл суміші антитіл для FACS, що містить антитіла, призначені для виявлення CD8 (APCCy7-антитіло до людського CD8 , фірма Biolegend, № 301016), CD4 (FITC-антитіло до людського CD4 , фірма Biolegend, № 300506), CD69 (BV421-антитіло до людського CD69 , фірма Biolegend, № 310930), CD25 (PECy7-антитіло до людського CD25 , фірма Biolegend, № 302612), CD22 (APC-антитіло до людського CD22 , фірма Biolegend, № 302510) і CD45 (PerCPCy5.5-антитіло до людського CD45 , фірма Biolegend, № 304028). Після інкубації протягом 15 хв при кімнатній температурі кров фіксували за допомогою лізуючого розчину для FACS (фірма BD, №349202) і аналізували за допомогою протокової цитометрії. Виснаження В-клітин розраховували на основі співвідношення кількості В-клітин і кількості CD4^+ -Т-клітин, приймаючи виснаження В-клітин в необроблених зразках за 0 %.

Результати цього експерименту представлені на фіг. 8 і 9. Обидві молекули мали порівняну

активністю стосовно виснаження В-клітин в цільній крові і активації Т-клітин.

Зв'язування антитіла до CD3/до CD20 у вигляді ТСВ з клітинами-мішенями, які експресують людський CD20 і CD3

Зв'язування антитіла до CD3/до CD20 у вигляді ТСВ, позначеного вище як молекула "Б", тестували на лінії клітин дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми (DLBCL), що експресує людський CD20 (WSU DLCL2, $0,5-1 \times 10^6$ сайтів зв'язування CD20) і іморталізований лінії Т-лімфоцитів (Jurkat), що експресує CD3. У цілому, метод полягав у наступному: клітини збирали, підраховували, визначали життєздатність і ресуспендували з розрахунку $1,5 \times 10^6$ клітин/мл в FACS-буфері (ЗФР, 0,1 % БСА). 100 мкл клітинної суспензії (що містить $0,15 \times 10^6$ клітин) інкубували в круглодонному 96-лунковому планшеті протягом 30 хв при 4°C зі зростаючими концентраціями CD20 ТСВ (50нМ - 200нМ), промивали двічі холодним ЗФР, 0,1 % БСА, повторно інкубували протягом ще 30 хв при 4°C з розведеним вторинним антитілом, кон'югованим з PE F(ab')₂-фрагментом козячим антилюдським IgG, AffiniPure Fcg-фрагмент специфічним (фірма Jackson Immuno Research Lab PE, № 109-116-170), промивали тричі холодним ЗФР, 0,1 % БСА, фіксували, додаючи 2 % PFA, і аналізували за допомогою FACS, застосовуючи пристрій FACS Cantoll (програма FACS Diva), виключаючи з аналізу мертві клітини шляхом FSC/SSC-дискримінації (дискримінація на основі сигналів розсіювання FSC (детектор прямого світлорозсіювання/SSC (детектор бічного світлорозсіювання)).

Результати представлені на фіг. 10А (зв'язування з клітинами WSU DLCL2) і на фіг. 10Б (зв'язування з клітинами Jurkat). Криві зв'язування і величини EC₅₀, що характеризують зв'язування, розраховували за допомогою програми GraphPadPrism5. Величини EC₅₀ становили 0,98нМ (двовалентне зв'язування з клітинами WSU DLCL2, які експресують CD20) і приблизно 12,5нМ (одновалентне зв'язування з клітинами Jurkat, які експресують CD3).

Зв'язування антитіла до CD3/до CD20 у вигляді ТСВ з клітинами-мішенями, які експресують CD20 і CD3, людини і мавп циномогус

Перефресну реактивність антитіла до CD3 /до CD20 у вигляді ТСВ, позначеного вище як молекула "Б", оцінювали за зв'язуванням з В-клітинами, які експресують CD20, людини і мавп циномогус і Т-клітинами, які експресують CD3 CD4- і CD8. У цілому, метод полягав у наступному: гепаринізовану кров людини і мавп циномогус здорових донорів застосовували для виділення РВМС шляхом центрифугування в градієнті густини. Виділені РВМС підраховували, оцінювали життєздатність і ресуспендували з розрахунку 4×10^6 клітин/мл в FACS-буфері (100 мкл ЗФР, 0,1 % БСА). 100 мкл клітинної суспензії (що містить $0,4 \times 10^6$ клітин) висівали в 96-лунковий планшет з U-подібним дном і центрифугували (420 × g, 4 хв). Після видалення супернатантів РВМС інкубували протягом 30 хв при 4°C зі зростаючими концентраціями CD20 ТСВ-AlexaFluor488 (200нМ - 200нМ), промивали двічі холодним ЗФР, 0,1 % БСА, повторно інкубували протягом ще 30 хв при 4°C з антитілами, що дають перефресну реакцію з антигенами людини/мавп циномогус: антитілом до D19 (розроблене в лабораторії заявників, клон 8В8)-AlexaFluor647, антитілом до CD4 (фірма BD, №552838, клон L200)-PerCPCy5.5 і антитілом до CD8 (фірма BD, №555367, клон RPA-T8)-PE. Через 30 хв РВМС промивали двічі холодним ЗФР, 0,1 % БСА і обробляли лізуючим розчином для FACS (фірма BD, № 349202), після чого здійснювали FACS-аналіз з використанням пристрою FACS Cantoll (програма FACS Diva). Криві зв'язування одержували за допомогою програми GraphPadPrism5.

Результати представлені на фіг. 11А (зв'язування з В-клітинами людини і мавп циномогус), фіг. 11Б (зв'язування з CD4-Т-клітинами людини і мавп циномогус) і фіг. 11В (зв'язування з CD8-Т-клітинами людини і мавп циномогус). Величини EC₅₀, які характеризують зв'язування з В-клітинами, які експресують CD20, розраховували за допомогою програми GraphPadPrism5, вони становили 4,8нМ (людські В-клітини) і 3,3нМ (В-клітини мавп циномогус).

Лізис Т-клітин, опосередкований різними форматами антитіл до CD20 /до CD3 у вигляді ТСВ

Лізис пухлинних клітин, опосередкований різними форматами антитіл до CD20/до CD3 у вигляді ТСВ (молекули "Б", "А", "В" і "С", описані вище) оцінювали на клітинах Z138 (лімфома з клітин мантиї, $0,06-0,23 \times 10^6$ сайтів зв'язування CD20). Людські РВМС застосовували як ефektorні клітини і лізис пухлин визначали після інкубації протягом 21-24 год. з різними форматами біспецифічних антитіл. У цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали, промивали і висівали з густиною 50000 клітин/лунку в 96-лункові планшети з U-подібним дном. Мононуклеарні клітини периферичної крові (РВМС) одержували центрифугуванням в градієнті густини Histopaque крові здорової людини. Свіжу кров розводили стерильним ЗФР і нашаровували на градієнт Histopaque (фірма Sigma, №H8889). Після центрифугування (450 × g, 30 хв, кімнатна температура, без перерви) плазму над інтерфазою, що містить РВМС, відкидали і РВМС переносили в нову фальконовську пробірку, в яку потім добавляли 50 мл ЗФР. Суміш центрифугували (350 × g, 10 хв, кімнатна температура),

супернатант відкидали і дебрис PBMC промивали двічі стерильним ЗФР (300 × g, 10 хв). Здійснювали автоматичний підрахунок (ViCell) одержаної популяції PBMC і витримували у середовищі RPMI1640, що містить 10 % FCS і 1 % L-аланін-L-глутаміну (фірма Biocrom, K0302) в інкубаторі для клітин при 37 °C, 5 % CO₂ аж до подальшого використання (не більше 24 год.).

Для аналізу лізису пухлин антитіла добавляли в зазначених концентраціях (діапазон від 0,1 пМ до 1 нМ в трьох повторностях). PBMC добавляли до клітин-мішеней в кінцевому співвідношенні Е:Т, що дорівнює 6:1. Лізис пухлинних клітин оцінювали після інкубації протягом 21-24 год. при 37 °C, 5 % CO₂ шляхом кількісного оцінювання ЛДГ, що вивільнилася в клітинні супернатанти апоптозними/некротизованими клітинами (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit), фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) одержували шляхом інкубації клітин-мішеней з Тритоном Х-100 в концентрації 1 %. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав спільній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без біспецифічної конструкції.

На фіг. 12 представлені різні формати антитіл CD20 TCB, які індукували сильний і мішень специфічний лізис CD20⁺-клітин-мішеней. На панелі А продемонстровано, що "CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована" (молекула "Б", описана вище) має активність, порівняну з активністю молекули "CD20 TCB_2+1_без зарядів, інвертована" (молекула "А", описана вище), і що обидві були більш ефективними, ніж молекула формату "CD20 TCB_1+1_з зарядами" (молекула "Є", описана вище). На панелі Б продемонстровано, що "CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована" (молекула "Б", описана вище) є більш ефективною, ніж молекула формату "CD20 TCB_2+1_з зарядами, класична" (молекула "В", описана вище). Величини EC₅₀, визначені в аналізах з оцінювання цитолізу, які розраховували за допомогою програми GraphPadPrism5, представлені в таблиці 5.

Таблиця 5

Величини EC₅₀ (пМ), які характеризують лізис пухлинних клітин, опосередкований різними форматами антитіл до CD20/до CD3 у вигляді ТCB, визначені з використанням експресуючих CD20 пухлинних клітин-мішеней Z138

Панель	Формат антитіла до CD20	EC ₅₀ [пМ]
А	CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (молекула Б)	2,18
А	CD20 TCB_2+1_без зарядів, інвертована (молекула А)	0,76
А	CD20 TCB_1+1_з зарядами (молекула Є)	17,54
Б	CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (молекула Б)	0,96
Б	CD20 TCB_2+1_з зарядами, класична (молекула В)	43,34

Лізис пухлинних клітин і наступна Т-клітинна активація, опосередковані різними форматами антитіл до CD20/до CD3 у вигляді ТCB

Лізис пухлинних клітин, опосередкований різними форматами антитіл до CD20/до CD3 у вигляді ТCB (молекули "Б" і "І", описані вище) додатково оцінювали на клітинах Z138 (лімфома з клітин мантиї), використовуючи людські PBMC з трьох здорових донорів, а також більш широкую панель клітинних ліній DLBCL, включаючи OCI Ly-18 (0,06-0,2 × 10⁶ сайтів зв'язування CD20), Ramos (0,1-0,4 × 10⁶ сайтів зв'язування CD20), SU-DHL-5 (0,13-0,21 × 10⁶ сайтів зв'язування CD20), SU-DHL-8 (рівень сайтів зв'язування CD20 нижче межі виявлення методу), Toledo (0,02 × 10⁶ сайтів зв'язування CD20) і U2932 (0,09-0,4 × 10⁶ сайтів зв'язування CD20). Пухлинні клітини збирали, PBMC виділяли і здійснювали аналіз в умовах, аналогічних описаним в попередньому прикладі. Співвідношення Е:Т, що застосовується в аналізах, результати яких показані на фіг. 13 А-В, становило 6:1, для аналізу, результати якого показані на фіг. 13Г, воно становило 3:1. Лізис пухлинних клітин оцінювали після інкубації протягом 21 год. при 37 °C, 5 % CO₂ шляхом кількісного оцінювання ЛДГ, що вивільнилася в клітинні супернатанти апоптозними/некротизованими клітинами (набір для детекції ЛДГ (LDH detection kit), фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Для оцінювання Т-клітинної активації, що відбувається після лізису пухлинних клітин, PBMC переносили в круглодонний 96-лунковий планшет, центрифугували при 400 × g протягом 5 хв і промивали двічі ЗФР, що містить 0,1 % БСА. Забарвлення для виявлення на поверхні CD8 (APCCy7-антитіло до людського CD8, фірма Biolegend, № 301016), CD4 (ФІТЦ-антитіло до людського CD4, фірма Biolegend, № 300506) і CD25 (PECy7-антитіло до людського CD25, фірма Biolegend, № 302612) здійснювали відповідно до рекомендацій постачальника. Клітини промивали двічі, використовуючи 150 мкл/лунку ЗФР, що містить 0,1 % БСА, і фіксували за допомогою 2 % PFA або лізуючого розчину для FACS

(фірма BD, № 349202). Зразки аналізували за допомогою пристрою BD FACS Cantoll.

На фіг. 13 продемонстровано, що антитіло формату "CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована" (молекула "Б", описана вище) є більше ефективним, ніж антитіло формату "CD20 TCB_1+1" (молекула "Є", описана вище) за результатами оцінювання як лізису пухлинних клітин (панелі А, Г), так і Т-клітинної активації (панелі Б, В) при використанні РВМС різних донорів. Величини EC_{50} , які характеризують лізис пухлин і Т-клітинну активацію при використанні клітин Z138, представлені в таблиці 6а. Величини EC_{50} , які характеризують лізис пухлин, одержані в аналізах з використанням панелі клітинних ліній DLBCL, представлені в таблиці 6б. Величини EC_{50} розраховували за допомогою програми GraphPad Prism5.

Таблиця 6а

Величини EC_{50} (пМ), які характеризують лізис пухлинних клітин і Т-клітинну активацію, опосередковувані антитілами до CD20/до CD3 у вигляді TCB, визначені з використанням експресуючих CD20 пухлинних клітин-мішеней Z138

Формат антитіла до CD20	EC_{50} [пМ] 24 год. (середнє для 3 донорів)
CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (лізис пухлин) (молекула Б)	1,6
CD20 TCB_1+1 (лізис пухлин) (молекула І)	751
CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (активація CD8-Т-клітин) (молекула Б)	2,2
CD20 TCB_1+1 (активація CD8-Т-клітин) (молекула Є)	174,8
CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (активація CD4-Т-клітин) (молекула Б)	1,2
CD20 TCB_1+1 (активація CD4-Т-клітин) (молекула Є)	122

Таблиця 6б

Величини EC_{50} (пМ), які характеризують лізис пухлин DLBCL з панелі ліній пухлинних клітин, опосередкований антитілами до CD20/до CD3 у вигляді TCB

EC_{50} [пМ] через 24 год., лізис пухлин	CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (молекула Б)	CD20 TCB_1+1 (молекула Є)
Ocl-18	0,3	250,4
Ramos	n.d.	n.d.
SU-DHL-5	1,2	69,7
SU-DHL-8	0,5	218,9
Toledo	n.d.	120,2
U2932	0,9	72,7

Виснаження В-клітин в людській цільній крові, опосередковуване різними форматами антитіл до CD20/до CD3 у вигляді TCB

Виснаження здорових В-клітин, опосередковуване різними форматами антитіл до CD20/до CD3 у вигляді TCB (молекули "Б" і "Є", описані вище) і обінутумабом, додатково вивчали з використанням свіжої людської крові здорових добровольців. У цілому, метод полягав у наступному: свіжу кров збирали в шприці, які містять гепарин. Аліквоти крові (180 мкл/лунку) поміщали в 96-лункові планшети з глибокими лунками, вносили розведення TCB або антитіла (10 мкл/лунку + 10 мкл/лунку ЗФР) і інкубували протягом 24 год. при 37 °C у вологій камері для клітин в атмосфері з 5 % CO_2 . Після інкубації кров перемішували за допомогою піпетки, потім переносили аліквоти крові об'ємом 35 мкл в 96-лункові планшети з U-подібним дном і інкубували з флуоресцентоміченими антитілами до CD45 (APC, фірма Biolegend, № 304037), до CD4 (PerCPy5.5, фірма BD, № 552838), до CD8 (APCCy7, фірма Biolegend, № 301016), до CD19 (PE, фірма Biolegend, № 302208), до CD25 (PECy7, фірма Biolegend, № 302612) і до CD69 (BV421, фірма Biolegend, № 310930) в загальному об'ємі 55 мкл для аналізу методом протокової цитометрії. Після інкубації протягом 15 хв при кімнатній температурі (в темряві) добавляли 180 мкл/лунку лізуючого розчину для FACS (фірма BD Biosciences) для виснаження еритроцитів і для фіксації клітин перед здійснення протокової цитометрії.

На фіг. 14 продемонстровано, що конструкція "CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована" (молекула "Б", описана вище) є більш ефективною щодо виснаження здорових В-клітин, ніж як обінутузмаб (газива), так і "CD20 TCB_1+1" (молекула "Є", описана вище).

Таблиця 7

Величини EC_{50} (пМ), які характеризують виснаження В-клітин в цільній крові здорової людини різними антитілами, мішенню яких є CD20

Антитіла, спрямовані проти CD20	EC_{50} [пМ], 24 год.
CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (молекула Б)	13,2
Обінутузмаб (Gazyva®)	79,2
CD20 TCB_1+1 (молекула Є)	3753

5

Активация Т-клітин, оцінена кількісно за інтенсивністю передачі сигналів CD3 в прямому напрямку за допомогою репортерного аналізу Jurkat-NFAT

Здатність різних форматів антитіл до CD20/до CD3 у вигляді TCB індукувати перехресне зшивання Т-клітин і, як наслідок, Т-клітинну активацію оцінювали з застосуванням спільних культур експресуючих CD20 пухлинних клітин-мішеней і репортерних клітин Jurkat-NFAT (експресуюча CD3 репортерна лінія людських клітин гострого лімфолейкозу з промотором NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, фірма Promega, № CS176501). Після одночасного зв'язування анти-CD20/анти-CD3 TCB з антигеном CD20 (який експресується на пухлинних клітинах) і антигеном CD3 (який експресується на репортерних клітинах Jurkat-NFAT) промотор NFAT активується, і це приводить до експресії активної люціферази світлячка. Інтенсивність люмінесцентного сигналу (одержаного після додавання субстрату люціферази) пропорційна інтенсивності активації і передачі сигналів CD3. Репортерні клітини Jurkat-NFAT вирощували в суспензії і культивували у середовищі RPMI1640, 2 г/л глюкози, 2 г/л $NaHCO_3$, 10 % FCS, 25мМ HEPES, 2мМ L-глутамін, 1 × NEAA, 1 × піруват натрію з густиною 0,1 - 0,5 млн клітин на мл з додаванням 200 мкг на мл гігromіцину. Для аналізу пухлинні клітини-мішені (Z138) збирали і визначали життєздатність за допомогою пристрою ViCell. До клітин-мішеней добавляли 50 мкл/лунку розведених антитіл або середовища (як контроль). Висівали 20000 клітин/лунку в плоскодонний 96-лунковий планшет з білими стінками (№ 655098, фірма Greiner bio-one). Потім збирали репортерні клітини Jurkat-NFAT і оцінювали їх життєздатність за допомогою пристрою ViCell. Клітини ресуспендували з густиною 2 млн клітин/мл у середовищі для культивування клітин без гігromіцину В і добавляли до пухлинних клітин з густиною $0,1 \times 10^6$ клітин/лунку (50 мкл/лунку) з отриманням кінцевого співвідношення Е:Т 5:1 і кінцевого об'єму 100 мкл на лунку. Клітини інкубували протягом 6 год. при 37 °C у вологій камері. Після закінчення інкубації в лунки добавляли 100 мкл/лунку розчину ONE-Glo (об'ємне співвідношення 1:1 ONE-Glo і середовища для аналізу на лунку) і інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі в темряві. Люмінесценцію визначали за допомогою рідера для ELISA WALLAC Victor3 (фірма PerkinElmer2030), тривалість детекції становила 5 с/лунку.

На фіг. 15 продемонстровано, що конструкція "CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована" (молекула "Б" описана вище) приводить до більш сильної Т-клітинної активації і передачі сигналів CD3 в прямому напрямку, ніж "CD20 TCB_1+1" (молекула "Є", описана вище).

Таблиця 8

Величини EC_{50} (пМ), які характеризують активацію CD3, виявлену за допомогою репортерних клітин Jurkat-NFAT

Формат антитіла до CD20	EC_{50} [пМ]
CD20 TCB_2+1_з зарядами, інвертована (молекула Б)	28,98
CD20 TCB_1+1 (молекула Є)	1001

ФК дослідження із застосуванням одноразової дози анти-CD20/анти-CD3 TCB, проведене на здорових NOG-мишах

Здійснювали фармакокінетичне дослідження із застосуванням одноразової дози (SDPK) для оцінювання експозиції анти-CD20/анти-CD3 TCB-молекули "Б" (далі у контексті даного опису

позначена як "CD20 TCB") в процесі проведення дослідів з оцінки ефективності (фіг. 16). Здійснювали i.v.-болюсне введення дози 0,5 мг/кг мишам лінії NOG і відбирали зразки крові у визначені моменти часу для фармакокінетичного оцінювання. Для вимірювання загальних концентрацій CD20 TCB застосовували стандартний імуноаналіз. Калібрувальний діапазон стандартної кривої для CD20 TCB становив від 0,78 до 50 нг/мл, при цьому концентрація 15 нг/мл являла собою нижню межу кількісного визначення (LLOQ).

Виявлено двофазове зниження з бета-фазою часу напівжиття, що відповідає 10 дням (некомпартментальний аналіз), і кліренсом, що становить 8 мл/д/кг (2-компартментальна модель). Як і очікувалося, час напівжиття і кліренс були порівнянні з параметрами звичайного, "неспрямованого" IgG, що не має специфічної мішені (таблиця 9).

Для ФК-аналізу, моделювання і симуляції застосовували програму Phoenix v6.2 фірми Pharsight Ltd.

Таблиця 9

Фармакокінетичні параметри після i.v.-болюсного введення
CD20 TCB в дозі 0,5 мг/кг NOG-мишам

Час напівжиття	10 днів
Кліренс	7, мл/д/кг
C _{max}	9,4 мкг/мл
AUC	1554 год.×мкг/мл

Активність анти-CD20/анти-CD3 TCB щодо В-клітинного виснаження in vivo

Тестували активність CD20 TCB щодо виснаження В-клітин периферичної крові на повністю гуманізованих мишах лінії NOD/Shi-scid/IL-2R^{null} (NOG).

Повністю гуманізованих мишей лінії NOG віком 14 тижнів, що несуть фізіологічні рівні циркулюючих людських В- і Т-клітин (Hayakawa J. і ін., Stem Cells 27(1), 2009, сс. 175-182), обробляли або наповнювачем (n=7), або CD20 TCB (n=6) в дозі 0,5 мг/кг, яку вводили внутрішньовенно (i.v.) один раз на тиждень. Як продемонстровано на схемі експерименту, наведений на фіг. 17, у мишей відбирали зразки крові для аналізу В-клітин і Т-клітин через 1 і 3 дні після першої терапевтичної ін'єкції (D1, D3) і через 3 дні після другої (D10), в цей момент часу дослід припиняли. В більш пізній момент часу також вилучали селезінку для аналізу В-клітин і Т-клітин. Мишей обстежували за 4 дні до терапевтичної ін'єкції (D-4) для визначення кількості циркулюючих В- і Т-клітин на вихідному рівні. На фіг. 18 представлені дані про кількості В- і Т-клітин за даними протокової цитометрії ex vivo крові оброблених наповнювачем (ліва панель) і CD20 TCB (права панель) в різні моменти часу. Результати продемонстрували, що відбувалося дуже ефективне виснаження циркулюючих В-клітин вже через 1 день після ін'єкції CD20 TCB, і їх кількість залишалася на рівні, що не піддається виявленню протягом усього досліді. На противагу цьому, кількість циркулюючих Т-клітин лише короткочасно знижувалася в D1 після терапевтичної ін'єкції, повертаючись до вихідного рівня в D3, і залишалася стабільною протягом всього досліді. Аналізували також статус Т-клітинної активації в крові оброблених мишей в D3 і D10 після першої терапевтичної ін'єкції за допомогою протокової цитометрії ex vivo з застосуванням різних маркерів поверхні Т-клітин і маркера проліферації Ki67 (фіг. 19). У Т-клітин з оброблених CD20 TCB мишей виявлено активований фенотип в D3 після терапевтичної ін'єкції (верхня панель) з підвищувальною регуляцією маркерів активації CD25, 4-1BB, PD-1 і гранзиму-В (GZB) в субпопуляціях як CD4-, так і CD8-Т-клітин у порівнянні з Т-клітинами з контрольних мишей, оброблених наповнювачем. Т-клітини з оброблених мишей експресували також більш високі рівні маркера проліферації Ki67. В D10 після першої терапевтичної ін'єкції рівні більшості маркерів активації Т-клітин поверталися до вихідних значень за винятком GZB і PD-1, рівні експресії яких все ще залишалися більше високими у порівнянні з рівнями в групі, обробленій застосуванням як контроль наповнювачем.

На фіг. 20 продемонстровані результати аналізу В-клітин і Т-клітин, одержані при вивченні селезінки оброблених наповнювачем і CD20 TCB мишей в кінці досліді (D10). Встановлено, що обробка CD20 TCB опосередкувала дуже ефективне виснаження В-клітин в зазначеному вторинному лімфоїдному органі (фіг. 20А), в той час як кількість Т-клітин виявилася порівнянною з рівнями у мишей, оброблених застосуванням як контроль наповнювачем (фіг. 20Б). Статус Т-клітинної активації (фіг. 20В) виявився подібним з виявленим в крові і відрізнявся більш високим рівнем експресії GZB і PD-1 в селезінкових Т-клітинах оброблених мишей у порівнянні з контрольним обробленими наповнювачем мишами.

Взяті в сукупності, зазначені результати продемонстрували, що обробка CD20 TCB може опосередковувати дуже ефективне виснаження В-клітин периферичної крові вже через 1 день після терапевтичної ін'єкції, при цьому кількість В-клітин залишалося на рівні, що не піддається виявленню, аж до закінчення експерименту (три дні після другої терапевтичної ін'єкції).

Виявлено також ефективне виснаження В-клітин в селезінці оброблених мишей. Активність В-клітинного виснаження виявилась паралельною активності короткочасної Т-клітинної активації в крові оброблених тварин, яка поверталася до вихідного рівня через 3 дні після терапевтичної ін'єкції за винятком маркерів активації GZB і PD-1, експресія яких зберігалася на більш високому рівні у порівнянні з необробленим контролем.

Протипухлинна активність анти-CD20/анти-CD3 TCB на моделі WSU-DLCL2

Протипухлинну активність CD20 TCB тестували на NOG-мишах, які несуть клітини людського дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми лінії WSU-DLCL2, і яким вводили моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) людину. У цілому, метод полягав у наступному: самкам NOG-мишей ін'єктували підшкірно (s.c.) $1,5 \times 10^6$ клітин WSU-DLCL2 (початково одержаних з Європейської колекції клітинних культур). Коли середній об'єм пухлин досягав 200 мм^3 , мишам вводили за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції людські PBMC (10×10^6 клітин на мишу) як джерела людських Т-клітин. Через 2 дні мишей піддавали терапевтичній i.v.-обробці CD20 TCB в дозі 0,5 мг/кг, яку вводили 1 раз на тиждень. Як продемонстровано на фіг. 21, CD20 TCB мала високу протипухлинну активність, викликаючи майже повний регрес пухлин в кінці експерименту (день 34).

Приклад 2

Одержання біспецифічного антитіла, що активує Т-клітини, "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів і без них (анти-BCMA/анти-CD3)

Схематичні ілюстрації молекул, одержаних в цьому прикладі, представлені на фіг. 22. Молекула анти-BCMA/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab, інвертована" без модифікацій зарядів (позначена в цьому прикладі як "83A10-TCB") містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 22-25, молекула анти-BCMA/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (позначена в цьому прикладі як "83A10-TCBcv") містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 26-29.

Для створення векторів для BCMA×CD3 біспецифічних антитіл застосовували одержані з IgG1 біспецифічні молекули, що складаються принаймні з двох антигензв'язувальних фрагментів, які мають здатність зв'язуватися специфічно з двома різними антигенними детермінантами CD3 і BCMA. Антигензв'язувальні фрагменти являли собою Fab-фрагменти, які складаються з важкого і легкого ланцюга, кожний з яких містить варіабельну і константну область. Принаймні один з Fab-фрагментів являв "Crossfab"-фрагмент, в якому обмінени VH і VL. Обмін VH і VL в Fab-фрагменті гарантує, що Fab-фрагменти з різною специфічністю не будуть мати ідентичні організації доменів. Сконструйована біспецифічна молекула була одновалентною щодо CD3 і двовалентною щодо BCMA, в якій один Fab-фрагмент злитий з N-кінцем внутрішнього CrossFab (2+1). Біспецифічна молекула містила Fc-область для подовження часу напівжиття молекули. Молекули одержували шляхом котрансфекції клітин HEK293 EBNA, що ростуть в суспензії, експресійними векторами для клітин ссавців з використанням поліетиленіміну (PEI). Для одержання конструкцій 2+1 CrossFab-IgG клітини трансфектували відповідними експресійними векторами у співвідношенні 1:2:1:1 ("вектор Fc(виступ)": "вектор легкого ланцюга": "вектор легкого ланцюга CrossFab": "вектор важкого ланцюга-CrossFab").

Для біспецифічних антитіл інтродукція заміни/обміну в одне зв'язує плече "Crossfab" значно знижує кількість побічних продуктів, але зазначений шлях одержання не повністю вільний від побічних продуктів (що описано докладно в WO 2009/080252 і у Schaefer W. і ін., PNAS, 108, 2011, ss. 11187-11191). Таким чином, для додаткового зниження побічних продуктів, утворення яких пов'язане з помилковим спарюванням легкого ланцюга антитіла до першого антигена з "неправильним" важким ланцюгом антитіла до другого антигена, і для підвищення виходу біспецифічного антитіла застосовували додатковий підхід до створення молекули шляхом інтродукції заряджених амінокислот з протилежним зарядом в специфічні амінокислотні положення в CH1- і CL-доменах, при цьому (I) в константному домені CL першого легкого ланцюга, зазначеного у підпункті а), амінокислоту в положенні 124 заміняли незалежно на лізин (К), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (К), аргінін (R)), і в константному домені CH1 першого важкого ланцюга, зазначеного у підпункті а), амінокислоту в положенні 147 або амінокислоту в положенні 213 заміняли незалежно на глутамінову кислоту (Е) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до Кебота); або II) в константному домені CL другого легкого ланцюга,

зазначеного у підпункті б), амінокислоту в положенні 124 заміняли безпосередньо на лізин (К), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до Кебота) (в одному кращому варіанті здійснення винаходу незалежно на лізин (К), аргінін (R)), і в константному домені CH1 другого важкого ланцюга, зазначеного у підпункті б), амінокислоту в положенні 147 або амінокислоту в положенні 213 заміняли незалежно на глутамінову кислоту (E) або аспарагінову кислоту (D) (нумерація відповідно до Кебота).

Для одержання біспецифічних антитіл біспецифічні антитіла експресували в HEK293-EBNA-клітинах шляхом короточасної котрансфекції відповідними експресійними векторами для клітин ссавців, які культивували в суспензії, з використанням поліетиленіміну (PEI). За 1 день до трансфекції клітини HEK293-EBNA висівали з розрахунку 1,5 млн життєздатних клітин/мл в середовище Ex-Cell, доповнене 6мМ L-глутаміном. Для одержання кожного 1 мл кінцевого об'єму для виробництва центрифугували 2 млн життєздатних клітин (5 хв при 210 × g). Супернатант видаляли аспірацією і клітини ресуспендували в 100 мкл середовища CD CHO. Для одержання кожного 1 мл кінцевого об'єму для виробництва, що містить ДНК, змішували 1 мкг ДНК (співвідношення важкий ланцюг: модифікований важкий ланцюг: легкий ланцюг: модифікований легкий ланцюг = 1:1:2:1) в 100 мкл середовища CD CHO. Після добавлення 0,27 мкл розчину PEI (1 мг/мл) суміш інтенсивно перемішували протягом 15 с і витримували при кімнатній температурі протягом 10 хв. Через 10 хв ресуспендовані клітини і суміш ДНК/PEI об'єднували і потім переносили в відповідний контейнер, який поміщали в шейкер (37 °C, 5 % CO₂). Після інкубації протягом 3 год. добавляли 800 мкл середовища Ex-Cell, доповненого 6мМ L-глутаміном, 1,25мМ вальпроєвою кислотою і 12,5 % Pepsoy (50 г/л) на кожний 1 мл кінцевого об'єму для виробництва. Через 24 год. добавляли 70 мкл Feed (SF40, фірма Lonza) на кожний 1 мл кінцевого об'єму для виробництва. Через 7 днів або після того, коли життєздатність клітин ставала рівною 70 % або нижче, клітини відокремлювали від супернатанта центрифугуванням і піддавали стерилізуючій фільтрації. Антитіла очищали за допомогою стадії афінної хроматографії і однієї або двох стадій остаточної очистки з використанням катіонообмінної хроматографії та гель-фільтрації. За потреби застосовували додаткову стадію остаточної очистки.

При здійсненні стадії афінної хроматографії супернатант завантажували в колонку з білком A (HiTrap Protein A FF, 5 мл, фірма GE Healthcare), врівноважену 6 CV буфера, що містить 20мМ фосфат натрію, 20мМ цитрат натрію, рН 7,5. Після стадії промивання таким же буфером антитіло елюювали з колонки, використовуючи стадію елюції буфером, що містить 20мМ фосфат натрію, 100мМ хлорид натрію, 100мМ гліцин, рН 3,0. Фракції, які містять необхідне антитіло, негайно нейтралізували 0,5М фосфатом натрію, рН 8,0 (1:10), об'єднували і концентрували центрифугуванням. Концентрат піддавали стерилізуючій фільтрації і додатково обробляли за допомогою катіонообмінної хроматографії і/або гель-фільтрації.

При здійсненні стадії катіонообмінної хроматографії концентрований білок розводили у співвідношенні 1:10 таким же буфером для елюції, який застосовували для стадії афінної хроматографії, і завантажували в катіонообмінну колонку (Poros 50 HS, фірма Applied Biosystems). Після двох стадій промивання врівноважувачим буфером і промивним буфером, які містили відповідно 20мМ фосфат натрію, 20мМ цитрат натрію, 20мМ Трис, рН 5,0 і 20мМ фосфат натрію, 20мМ цитрат натрію, 20мМ Трис, 100мМ хлорид натрію, рН 5,0, білок елюювали за допомогою градієнта, використовуючи 20мМ фосфат натрію, 20мМ цитрат натрію, 20мМ Трис, 100мМ хлорид натрію. рН 8,5. Фракції, які містять необхідне антитіло, об'єднували, концентрували центрифугуванням, піддавали стерилізуючій фільтрації і додатково обробляли, використовуючи стадію гель-фільтрації.

При здійсненні стадії гель-фільтрації концентрований білок ін'єктували в колонку XK16/60 HiLoad Superdex 200 (фірма GE Healthcare), застосовуючи як буфер для композиції 20мМ гістидин, 140мМ хлорид натрію, рН 6,0 з додаванням Твін20 або без нього. Фракції, які містять мономери, об'єднували, концентрували центрифугуванням і піддавали стерилізуючій фільтрації, поміщали в стерильну пляшечку.

Визначення концентрації антитіла здійснювали під довжині хвилі абсорбції 280 нм, використовуючи теоретичне значення абсорбції 0,1 %-вого розчину антитіла. Ця величина базувалася на амінокислотній послідовності і її розраховували за допомогою програми GPMW (фірма Lighthouse data).

Чистоту і вміст мономера кінцевого препарату білка визначали за допомогою KE-ДСН (система Caliper LabChip GXII (фірма Caliper Life Sciences)), відповідно PXPB (аналітична колонка для гель-фільтрації TSKgel G3000 SW XL (фірма Tosoh)) в буфері, що містить 25мМ фосфат калію, 125мМ хлорид натрію, 200мМ моногідрохлорид L-аргініну, 0,02 % (мас./об.) азиду натрію, рН 6,7.

Для підтвердження молекулярної маси кінцевих білкових препаратів і підтвердження гомогенності препарату молекул в кінцевому білковому розчині застосовували рідинну хроматографію-мас-спектрометрію (PX-МС). Спочатку здійснювали стадію деглікозилювання. Для усунення пов'язаної з вуглеводами гетерогенності конструкції обробляли PNGазойF (фірма ProZyme). Для цієї мети значення pH білкової розчину доводили до pH 7,0, додаючи 2 мкл 2М Трис до 20 мкг білка з концентрацією 0,5 мг/мл. Додавали 0,8 мкг PNGазиF і інкубували протягом 12 год. при 37 °С. Потім здійснювали онлайн детекцію за допомогою PX-МС. Для здійснення методу PX-МС застосовували пристрій Agilent HPLC 1200, сполучений з мас-спектрометром TOF 6441 (фірма Agilent). Хроматографічне розділення здійснювали на полістирольний колонці Macherey Nagel; RP1000-8 (розмір частинок 8 мкм, 4,6 × 250 мм; каталожний № 719510). Елюент А являв собою 5 % ацетонітрилу і 0,05 об. % мурашиної кислоти в воді, елюент Б являв собою 95 % ацетонітрилу, 5 % води і 0,05 % мурашиної кислоти. Швидкість потоку становила 1 мл/хв, розділення здійснювали при 40 °С і з використанням 6 мкл (15 мкл) білкового зразка, одержаного за допомогою описаної вище обробки.

Час (хв.)	%Б
0,5	15
10	60
12,5	100
14,5	100
14,6	15
16	15
16,1	100

Одержаний протягом перших 4 хв елюат відправляли у відходи для попередження забруднення солями мас-спектрометра. Через ESI-джерело пропускали осушуючий газ зі швидкістю 12 л/хв, температура становила 350 °С і тиск в розпилювачі становив 60 фунтів на кв.дюйм. МС-спектри одержували, використовуючи напругу фрагментатора 380 В і діапазон мас від 700 до 3200 m/z в режимі позитивної іонізації. МС-дані отримували, використовуючи програмне забезпечення пристрою, починаючи з 4 хв і до 17 хв.

На фіг. 23 представлені зображення, одержані за допомогою KE-ДСН (невідновні умови) кінцевих білкових препаратів після застосування різних методів очистки антитіл 83A10-TCB і 83A10-TCBsv. Після стадій очистки антитіла 83A10-TCB за допомогою афінної хроматографії на білку А (РА) і гелі-фільтрації (SEC) встановлено, що його чистота становила <30 % і вміст мономера 82,8 % (А). Після застосування додаткових стадій очистки, які включають катіонообмінну хроматографію (cIEX) і кінцеву гелі-фільтрацію (re-SEC), кінцевих білкових препаратів, зазначених на фіг. 23А, чистота підвищувалася до 93,4 %, однак вміст мономерів залишався таким же і вихід значно знижувався, складаючи 0,42 мг/л. Однак, коли здійснювали специфічні модифікації зарядів в антитілі 83A10 анти-BCMA Fab CL-CH1, а саме, антитілі 83A10-TCBsv, одержували покращений профіль стосовно одержання/очистки TCB-молекули, про що свідчили чистота 95,3 %, вміст мономера 100 % і вихід аж до 3,3 мг/л, що можна було виявити вже після застосування стадій очистки РА+cIEX+SEC (фіг. 23В) у порівнянні з результатами, представленими на фіг. 23Б, з яких випливає, що профіль одержання/очистки характеризувався в 7,9 раз більш низьким виходом і на 17,2 % більш низьким вмістом мономера, незважаючи на включення додатковою стадії очистки з використанням re-SEC.

Потім здійснювали порівняння за принципом "голова-до-голови" профілю одержання/очистки антитіл 83A10-TCB і 83A10-TCBsv для додатковою оцінювання переваг модифікацій зарядів в CL-CH1 в антитілах. Як продемонстровано на фіг. 24, властивості антитіл 83A10-TCB і 83A10-TCBsv оцінювали в режимі "бік-до-боку" і порівнювали після кожної стадії очистки 1) тільки афінною РА-хроматографією (А, Б), 2) РА-афінною хроматографією з наступною SEC (В, Г) і 3) афінною РА-хроматографією з наступною SEC, після чого здійснювали cIEX і re-SEC (Г, Д). Графіки, що ілюструють результати, одержані за допомогою KE-ДСН (невідновні умови) кінцевих білкових розчинів після здійснення відповідних методів очистки антитіл 83A10-TCB і 83A10-TCBsv, представлені на фіг. 24. Як показано на фіг. 24А і 24Б, покращання, зв'язані з застосуванням варіантів зарядів, в антитілі у вигляді TCB, проявляються вже після очистки тільки афінною РА-хроматографією. В зазначеному досліді, проведеному з використанням принципу "голова-до-голови", здійснення стадії очистки антитіла 83A10-TCB афінною РА-хроматографією приводило до одержання продукту з чистотою 61,3 %, виходом 26,2 мг/л і вмістом мономера 63,7 % (фіг.24А). Для порівняння, коли антитіло 83A10-TCBsv очищали за допомогою афінної РА-хроматографії, всі показники покращувались, про що

свідчить більша частота, що становить 81,0 %, більший вихід, що становить 51,5 мг/л, і більш високий вміст мономера, що становить 68,2 % (фіг. 24Б). Коли застосовували додаткову стадію очистки за допомогою SEC кінцевих білкових препаратів, то, як продемонстровано на фіг. 24А і 24Б, у 83А10-ТСВ чистота підвищувалася до 69,5 %, вихід до 14,1 мг/л і вміст мономера до 74,7 %, для порівняння, у 83А10-ТСВсв чистота і вміст мономера підвищувалися до 91,0 % і 83,9 % відповідно, а вихід становив 10,3 мг/л. Навіть з урахуванням того, що вихід 83А10-ТСВсв злегка знижувався у порівнянні з 83А10-ТСВ (був на 27 % нижче) в цьому конкретному експерименті, відсотковий вміст "правильної" молекули виявився значно більш високим для 83А10-ТСВсв, ніж для 83А10-ТСВ, відповідно 90 % відносно 40-60 %, при вимірюванні за допомогою РХ-МС. При здійсненні третьої процедури порівняння за принципом "голова-до-голови" кінцеві препарати білків 83А10-ТСВ і 83А10-ТСВсв, зазначені на фіг. 24В і 24Г, об'єднували приблизно з 1 л (еквів'ємні співвідношення) відповідних кінцевих препаратів білків з другої очищеної партії (таке ж одержання) після очистки тільки за допомогою афінної РА-хроматографії. Потім об'єднані білкові препарати додатково очищали за допомогою методів очистки cІEX і SEC. Як продемонстровано на фіг. 24Г і 24Д, надійно підтверджено покращення профілю одержання/очистки антитіла у вигляді ТСВ з варіантами зарядів у порівнянні з антитілом у вигляді ТСВ без варіанту зарядів. Після декількох стадій із застосуванням різних методів очистки (тобто РА +/- SEC+cІEX+SEC), які використовували для очистки антитіла 83А10-ТСВ, чистота продукту досягала лише 43,1 % і вміст мономера, який вдалося досягти, становило 98,3 %, але при цьому погіршувався вихід, який знижувався до 0,43 мг/л. Відсотковий вміст правильної молекули, виміряний за допомогою РХ-МС, все ще залишалося низьким, становлячи 60-70 %. У цілому, якість кінцевого препарату білка виявилася неприйнятною для застосування *in vitro*. У повній протилежності до цього виявилось, що коли тим же самим стадіями очистки в такій же хронології піддавали антитіло 83А10-ТСВсв, то досягали чистоти 96,2 % і вмісту мономера 98,9 %, а також вмісту правильної молекули 95 % за даними, отриманими за допомогою РХ-МС. Однак вихід також істотно знижувався до 0,64 мг/л після стадії очистки за допомогою cІEX. Результати свідчать про те, що більш високої чистоти, більш високого вмісту мономера, більш високого відсоткового вмісту правильної молекули і більш високого виходу можна досягати у випадку антитіла 83А10-ТСВсв вже після двох стандартних стадій очистки, тобто афінної РА-хроматографії та SEC (фіг. 24Г), в той час як таких характеристик не вдавалося досягати у випадку 83А10-ТСВ, навіть при застосуванні додаткових стадій очистки (фіг. 24Г).

В таблиці 10 узагальнені властивості 83А10-ТСВ у порівнянні з 83А10-ТСВсв після стадії очистки з використанням РА. В таблиці 11 узагальнені властивості 83А10-ТСВ у порівнянні з 83А10-ТСВсв після стадій очистки з використанням РА і SEC. В таблиці 12 узагальнені властивості 83А10-ТСВ у порівнянні з 83А10-ТСВсв після стадій очистки з використанням тільки РА і SEC плюс РА з наступними стадіями очистки з використанням cІEX і re-SEC. В таблицях 10-12 величини, виділені жирним шрифтом, відповідають покращеним властивостям при порівнянні 83А10-ТСВ і 83А10-ТСВсв. За одним винятком, який може не бути репрезентативним, всі параметри одержання/очистки і всі величини, одержані в трьох порівняльних експериментах, проведених за принципом "голова-до-голови", виявилися більше високими для 83А10-ТСВсв у порівнянні з 83А10-ТСВ. У цілому, результати продемонстрували, що можна досягати переваг стосовно одержання/очистки при застосуванні модифікацій зарядів CL-CH1 в антитілах у вигляді ТСВ і що тільки дві стадії очистки (тобто афінна РА-хроматографія і SEC) були потрібні для досягнення вже високої якості білкових препаратів з дуже гарними технологічними властивостями.

Таблиця 10

Профіль одержання/очистки біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, до ВСМА/до CD3 після стадії очистки афінною хроматографією на білку А

	83А10-ТСВ	83А10-ТСВсв
Чистота (%)	61,3	81,0
Вихід (мг/л)	26,2	51,5
Кількість (мг)	24,3	50,2
Мономер (%)	63,7	68,2
"Правильна" молекула за даними РХ-МА (%)	n.d.	n.d.

Таблиця 11

Профіль одержання/очистки біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, до ВСМА/до CD3 після стадій очистки афінною хроматографією на білку А і гель-фільтрацією

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	69,5	91,0
Вихід (мг/л)	14,1	10,3
Кількість (мг)	13,1	10,0
Мономер (%)	74,7	83,9
"Правильна" молекула за даними PX-МА (%)	40-60	90

Таблиця 12

Профіль одержання/очистки біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, до ВСМА/до CD3 після стадій очистки 1.а) афінною хроматографією на білку А і гель-фільтрацією і 1.б) тільки афінною хроматографією на білку А при об'єднанні з наступною 2) катіонообмінною хроматографією і 3) кінцевою гель-фільтрацією

	83A10-TCB	83A10-TCBcv
Чистота (%)	43,1	96,2
Вихід (мг/л)	0,43	0,64
Кількість (мг)	0,73	1,27
Мономер (%)	98,3	98,9
"Правильна" молекула за даними PX-МА (%)	60-70 %	>95 %

Зв'язування біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, до ВСМА/до CD3 з ВСМА-позитивними клітинними лініями множинної мієломи (протокова цитометрія)

- 5 Аналізували за допомогою протокової цитометрії зв'язування антитіл до ВСМА/до CD3 у вигляді TCB (83A10-TCB, 13A4-TCBcv) з людським ВСМА на експресуючих ВСМА клітинах NCI-H929 (ATCC® CRL-9068™). Лінію MKN45 (лінії клітин людського аденокарциноми шлунку, що не експресує ВСМА) застосовували як негативний контроль. У цілому, метод полягав у наступному: культивовані клітини збирали, підраховували кількість і визначали життєздатність клітин за допомогою пристрою ViCell. Потім кількість життєздатних клітин доводили до 2×10^6 клітин на мл в FACS-буфері для забарвлення, що містить BCA (фірма BD Biosciences). 100 мкл зазначеної клітинної суспензії додатково розділяли на аліквоти для внесення в лунку круглодонного 96-лункового планшета і інкубували з 30 мкл антитіл до ВСМА або з відповідним застосовуванням як контроль IgG протягом 30 хв при 4°C. Всі антитіла до ВСМА/до CD3 у вигляді TCB (і TCB-контролі) титрували і аналізували в кінцевому діапазоні концентрацій від 1 до 300нМ. Потім клітини центрифугували (5 хв, 350 × g), промивали, використовуючи 120 мкл/лунку FACS-буфера для забарвлення (фірма BD Biosciences), ресуспендували і інкубували протягом ще 30 хв при 4 °C з кон'югованим з флуорохром, кон'югованим з PE F(ab')₂-фрагментом козячого антилюдського IgG AffiniPure, Fc-фрагмент специфічного (фірма Jackson Immuno Research Lab; 109-116-170). Потім клітини промивали двічі буфером для забарвлення (фірма BD Biosciences), фіксували з використанням 100 мкл фіксуючого BD-буфера на лунку (фірма BD Biosciences, 554655) при 4 °C протягом 20 хв, ресуспендували в 120 мкл FACS-буфера і аналізували за допомогою пристрою BD FACS Cantoll. Як продемонстровано на фіг. 25, будували графік залежності середньої інтенсивності флуоресценції антитіл до ВСМА/до CD3 у вигляді TCB від концентрацій антитіла; (А) 83A10-TCB на H929-клітинах і MKN45-клітинах, (Б) 83A10-TCBcv на H929-клітинах і MKN45-клітинах. Якщо це було можливо, розраховували EC₅₀ за допомогою програми Prism (фірма GraphPad, Ла-Джола, шт. Каліфорнія, США), і величини EC₅₀, що відповідають концентрації антитіла, необхідній для досягнення 50 % від максимального зв'язування, які характеризують зв'язування 83A10-TCB і 83A10-TCBcv з H929-клітинами, узагальнені в таблиці 13. На фіг. 25В продемонстровано, що 83A10-TCB і 83A10-TCBcv зв'язувалися з H929-клітинами залежно від концентрації і з подібною ефективністю. Зазначені результати були очікуваними, оскільки молекули 83A10-TCB і 83A10-TCBcv мають ідентичні послідовності CDR в відповідних варіабельних доменах VL і VH. Контрольне антитіло DP47-TCB не зв'язувалося з ВСМА-позитивними клітинами мієломи H929, за даними, які свідчать про відсутність підвищення медіанної інтенсивності флуоресценції. У другому, проведеному за принципом "голова-до-голови" порівняльному експерименті оцінювали

зв'язування 83A10-TCB і 83A10-TCBcv з BCMA-позитивними H929-клітинами і відсутність зв'язування з BCMA/CD3-негативними MKN45-клітинами. Як продемонстровано на фіг. 25Г, 83A10-TCB і 83A10-TCBcv зв'язувалися з BCMA-позитивними H929-клітинами залежно від концентрації і з подібною ефективністю. Величини EC₅₀, які характеризують зв'язування 83A10-TCB і 83A10-TCBcv з H929-клітинами в зазначеному другому експерименті, узагальнені в таблиці 14.

Таблиця 13

Величини EC₅₀, які характеризують зв'язування антитіл до BCMA/до CD3 у вигляді TCB з H929-клітинами (експеримент 1)

Анти-BCMA/анти-CD3 TCB-молекули	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (мкг/мл)
83A10-TCB	9,8	1,9
83A10-TCBcv	14,5	2,8

Таблиця 14

Величини EC₅₀, які характеризують зв'язування антитіл до BCMA/до CD3 у вигляді TCB з H929-клітинами (експеримент 2)

Анти-BCMA/анти-CD3 TCB-молекули	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (мкг/мл)
83A10-TCB	16,9	3,25
83A10-TCBcv	14,5	2,8

10 Переорієнтована Т-клітинна цитотоксичність щодо клітин мієломи лінії H929 з високим рівнем експресії BCMA, індукована біспецифічними антитілами, які активують Т-клітини, до BCMA/до CD3 (аналіз вивільнення ЛДГ)

15 Антитіла до BCMA/до CD3 у вигляді TCB аналізували також щодо їх здатності індукувати опосередкований Т-клітинами апоптоз клітин мієломи з високим рівнем експресії BCMA після перехресного зшивання конструкції за допомогою зв'язування антигензв'язувальних фрагментів з BCMA на клітинах. У цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені, що являють собою клітини множинної мієломи лінії H929, що експресують людський BCMA, збирали з використанням буфера для дисоціації клітин, промивали і ресуспендували у середовищі RPMI, доповненому 10 % фетальної бичачої сироватки (фірма Invitrogen). Висівали приблизно 30000

20 клітин на лунку в круглодонний 96-лунковий планшет і добавляли відповідне розведення конструкції антитіла до досягнення необхідної кінцевої концентрації (в трьох повторностях); кінцеві концентрації знаходилися в діапазоні від 0,1нМ до 10нМ. Для відповідного порівняння молярність всіх TCB-конструкцій і контролей доводили до однакового рівня. В лунки добавляли популяцію всіх Т-клітин (ефекторні клітини) до одержання кінцевого співвідношення ефектор: мішень (Е:Т) 5:1. Коли застосовували людські РВМС як ефекторні клітини, то використовували кінцеве співвідношення Е:Т 10:1. Для одержання груп, що представляють собою негативні контролю, застосовували тільки ефекторні клітини або клітини-мішені. Для позитивного контролю активації людських пан-Т-клітин застосовували 1 мкг/мл РНА-М (фірма Sigma, № L8902). Для стандартизації визначали максимальний лізис клітин-мішеней множинної мієломи (ММ) лінії

30 H929 (= 100 %) шляхом інкубації клітин-мішеней з Тритоном Х-100 в концентрації 1 %. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав спільній інкубації клітин-мішеней тільки з ефекторними клітинами, тобто без будь-якої біспецифічної конструкції, що активує Т-клітини. Після інкубації протягом 2-24 год. при 37 °С, 5 % CO₂ оцінювали вивільнення ЛДГ в супернатант із апоптозних/некротизованих клітин-мішеней мієломи за допомогою набору для детекції ЛДГ (фірма Roche Applied Science), відповідно до інструкцій виробника. Будували графік залежності вивільнення ЛДГ від концентрацій біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, до BCMA/до CD3 з отриманням кривих концентрація-відповідь. Якщо це було можливо, розраховували EC₅₀ за допомогою програми Prism (фірма GraphPad) і визначали як концентрацію антитіла у вигляді TCB, яка приводила до 50 %-вого від максимального вивільнення ЛДГ. Як продемонстровано на фіг. 26, антитіла до BCMA/до CD3 у вигляді TCB (83A10-TCB (А, Б), 83A10-TCBcv (В, Г)) індукували залежний від концентрації цитоліз BCMA-позитивних клітин мієломи H929 при оцінюванні за вивільненням ЛДГ. Цитоліз H929 виявився специфічним, оскільки контрольне антитіло DP47-TCB, яке не зв'язується з BCMA-позитивними клітинами-мішенями, не індукувало вивільнення ЛДГ, навіть при застосуванні в найбільш високій концентрації 1нМ (А). Навіть з

урахуванням того, що величини EC_{50} для 83A10-TCB (А, Б) і 83A10-TCB_{sv} (В, експеримент 1) не піддавалися визначенню за допомогою програми статистичного аналізу Prism (фірма GraphPad), приблизно можна визначити, що величини EC_{50} , які характеризують ефективність, знаходились в нижньому пікомолярному діапазоні, як для незаряджених, так і для заряджених TCB-молекул. У іншому експерименті оцінювали вплив 83A10-TCB_{sv} за допомогою аналізу визначення переорієнтованої Т-клітинної цитотоксичності і вдалось встановити, що величина EC_{50} становила 1,5 пМ. При оцінюванні результатів, одержаних при створенні винаходу, не слід виключати, що дещо більш низька величина EC_{50} (декілька краща ефективність) може бути наслідком варіабельності донорської крові. Однак встановлено, що величина, що характеризує здатність знищувати Н929-клітини, знаходиться в нижньому пікомолярному діапазоні. У цілому, результати дозволяють припустити, що 83A10-TCB (без варіанта зарядів) у порівнянні з 83A10-TCB_{sv} (з варіантом зарядів) мало подібні біологічні властивості при оцінюванні за допомогою проведених на клітинах аналізів.

Таблиця 15

Величини EC_{50} і результати оцінювання цитолізу переорієнтованими Т-клітинами Н929-клітин, індукованого антитілами до ВСМА/до CD3 у вигляді TCB

Анти-ВСМА/анти-CD3 TCB-молекули	EC_{50} (пМ)	EC_{50} (мкг/мл)
83A10-TCB (експеримент 1 1)	нижній пМ-діапазон (приблизно <20)	Однозначне число
83A10-TCB (експеримент 2)	нижній пМ-діапазон (приблизно <20)	Однозначне число
83A10-TCB _{sv} (експеримент 1)	нижній пМ-діапазон (приблизно <20)	Однозначне число
83A10-TCB _{sv} (експеримент 2)	1,5	0,3

Приклад 3

Одержання біспецифічного антитіла, що активує Т-клітини, "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (анти-Her2/анти-CD3) і біспецифічного антитіла, що активує Т-клітини, "2+1 IgG CrossFab" з модифікаціями зарядів (анти-Her3/анти-CD3)

Схематична ілюстрація молекул, одержання яких описано в цьому прикладі, представлена на фіг. 27. Молекула анти-Her2/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab, інвертована" з модифікаціями зарядів (позначена в даному прикладі як "Her2 TCB") містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 21, 52, 53 і 54. Молекула анти-Her3/анти-CD3 "2+1 IgG CrossFab" з модифікаціями зарядів (позначена в даному прикладі як "Her3 TCB") містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 21, 55, 56 і 57.

Молекули одержували, очищали і аналізували відповідно до методу, описаного вище в прикладі (з використанням однієї стадії препаративної SEC).

Обидві молекули можна очищати, досягаючи високої кінцевої якості, продемонстрованої за допомогою аналітичної гель-фільтрації і КЕ-ДСН (таблиці 16, 17). Хоча вихід Her2 TCB при такому одержанні був нижче у порівнянні з Her3 TCB, білок виявився практично чистим після двох стадій очистки (на білку А і SEC). За допомогою аналізу методом КЕ-ДСН продемонстровано наявність лише 1,18 % низькомолекулярних домішок з молекулярною масою приблизно 164 кДа (таблиця 17). Вид, виявлений при 187,28 кДа, відповідав молекулі-мішені без N-зв'язаного глікозилювання в Fc-доміні (цей вид, як правило, виявляється за допомогою КЕ-ДСН в людському IgG₁ після одержання в еукаріотичних клітинах).

Her3 TCB можна очищати з досягненням високого виходу. Кінцева якість перевищувала якість Her2 TCB при порівнянні вмісту кінцевого мономера. Крім того, за допомогою КЕ-ДСН продемонстровано присутність 100 % необхідного білка, враховуючи, що пік, виявлений при 192,05 кДа, відповідає неглікозильованому виду Fc.

Для обох препаратів за допомогою КД-ДСН або аналітичної гель-фільтрації не виявлено жодних пов'язаних з продуктом низькомолекулярних домішок, таких як вільні легкі ланцюги (очікувана молекулярна маса 25 кДа), димеризовані легкі ланцюги, які можуть утворюватися в результаті інтродукції тільки CH1-CL-обміну в одному легкому ланцюзі (очікувана молекулярна маса 50 кДа), або молекули з помилково або нековалентно зв'язаними легкими ланцюгами (очікувана молекулярна маса 125, 150 або 175 кДа).

Таблиця 16

Узагальнення даних про виробництво і очистку анти-Her2/анти-CD3 і анти-Her3/анти-CD3 TCB-молекул з модифікаціями зарядів

Молекула	Титр [мг/л]	Вихід [%]	Вихід [мг/л]	Аналітична SEC (HMW/мономер/LMW) [%]
Her2 TCB	45	1,8	1	3,3/96,7/0
Her3 TCB	72	12,7	11,42	0/100/0

Таблиця 17

Результати аналізу методом КЕ-ДСН (невідновні умови) анти-Her2/анти-CD3 і анти-Her3/анти-CD3 TCB-молекул з модифікаціями зарядів

Молекула	Пік, №	розмір [кДа]	Чистота [%]
Her2 TCB	1	163,99	1,18
	2	187,28	1,30
	3	200,81	97,52
Her3 TCB	1	192,05	19,36
	2	198,57	80,64

5 Зв'язування Her2 TCB і Her3 TCB з клітинами

Клітини Jurkat з суспензійної культури збирали, однократно промивали FACS-буфером (ЗФР + 0,1 % БСА) і визначали життєздатність за допомогою пристрою ViCell.

Прикріплені пухлинні клітини KPL-4 (люб'язно надані J. Kurebayashi, медична школа Кавасакі, Японія) збирали з використанням буфера для дисоціації клітин (фірма Gibco Invitrogen) і однократно промивали FACS-буфером перед визначенням життєздатності за допомогою пристрою ViCell.

По 0,2 млн клітин висівали на лунку круглодонного 96-лункового планшета і планшети центрифугували протягом 4 хв при 400× g. Потім до клітин добавляли по 25 мкг на лунку розведень TCB в FACS-буфері. Клітини інкубували протягом 30 хв в холодильнику. Потім клітини двічі промивали, використовуючи 150 мкл FACS-буфера на лунку.

25 мкл вторинного антитіла (кон'югований з ФІТЦ F(ab')₂-фрагмент козячого антилюдського IgG AffiniPure, F(ab')₂-фрагмент специфічного, фірма Jackson ImmunoResearch), що має відповідне розведення, добавляли в лунку і планшети забарвлювали протягом ще 30 хв при 4°C в темряві.

Планшети промивали двічі, використовуючи 150 мкл FACS-буфера на лунку, і ресуспендували в 150 мкл FACS-буфера. Аналіз здійснювали за допомогою пристрою BD FACS Cantoll, забезпеченого програмою FACS Diva. Будували графік залежності величин медіанної інтенсивності флуоресценції (MFI) від концентрації TCB-молекул.

Як продемонстровано на фіг. 29, для обох TCB виявлено високе залежне від концентрації зв'язування з відповідними антигенами-мішенями на клітинах.

Активация людських ефektorних CD8⁺-Т-клітин після опосередкованого Т-клітинами лізису людських пухлинних клітин, індукованого Her3 TCB

У класичному експерименті з лізису пухлинних клітин (описаному нижче) оцінювали активацию ефektorних CD8⁺-Т-клітин за допомогою Her3 TCB на основі відсотка CD69-позитивних клітин при використанні співвідношення ефектора до мішені (Е:Т) 10:1 і тривалості інкубації 48 год. У цілому, метод полягав у наступному: після інкубації PBMC переносили в круглодонний 96-лунковий планшет, центрифугували при 350 × g протягом 5 хв і промивали двічі ЗФР, що містить 0,1 % БСА. Забарвлення на поверхні CD8 (фірма Biolegend, № 300908) і CD69 (фірма BioLegend, № 310904) здійснювали відповідно до керівництва постачальника. Клітини промивали двічі, використовуючи 150 мкл/лунку ЗФР, що містить 0,1 % БСА, і фіксували протягом 20 хв при 4 °C, використовуючи 100 мкл/лунку 1 % PFA. Після центрифугування зразка ресуспендували в 200 мкл/лунку ЗФР, 0,1 % БСА і аналізували за допомогою пристрою FACS Cantoll (програма FACS Diva).

Як продемонстровано на фіг. 30, Her3 TCB індукує перехресне зшивання Т-клітин і пухлинних клітин (KPL-4) через відповідні спрямовані до мішеням фрагменти і індукує активацию

Т-клітин залежно від концентрації.

Аналіз активації Jurkat-NFAT

Здатність Her2 TCB і Her3 TCB індукувати перехресне зшивання Т-клітин і наступну Т-клітинну активацію досліджували, застосовуючи спільні культури позитивних за пухлинним антигеном клітини-мішені (KPL-4) і репортерні клітини Jurkat-NFAT (експресуюча CD3 репортерна лінія клітин гострого лімфолейкозу з промотором NFAT, GloResponse Jurkat NFAT-RE-luc2P, фірма Promega, № CS176501). Після одночасного зв'язування TCB-молекули з антигеном, що являє собою людський Her2, відповідно людський Her3 (який експресується на пухлинних клітинах), і антигеном CD3 (який експресується на репортерних клітинах Jurkat-NFAT) промотор NFAT активується і приводить до експресії активної люціфери світлячка. Інтенсивність люмінесцентного сигналу (одержаного після додавання субстрату люціфери) пропорційна інтенсивності активації і передачі сигналів CD3.

Для здійснення аналізу людські пухлинні клітини лінії KPL-4 збирали за допомогою буфера для дисоціації клітин (фірма Gibco Invitrogen) і визначали життєздатність за допомогою пристрою ViCell. Висівали по 20000 клітин/лунку в плоскодонний 96-лунковий планшет з білими стінками (фірма Greiner bio-one) і добавляли розведення TCB або середовище (як контролю). Потім збирали репортерні клітини Jurkat-NFAT і визначали життєздатність за допомогою пристрою ViCell. Клітини ресуспендували у середовищі для культури клітин і добавляли до пухлинних клітин з отриманням кінцевого співвідношення Е:Т 2,5:1 (для Her2 TCB) або 5:1 (для Her3 TCB), як зазначено, і кінцевого об'єму 100 мкл на лунку. Клітини інкубували протягом 5 год. при 37 °С у вологій камері. В кінці періоду інкубації добавляли в лунки 100 мкл/лунку розчину ONE-Glo (фірма Promega, №E6120) (об'ємне співвідношення 1:1 ONE-Glo і середовища для аналізу на лунку) і інкубували протягом 10 хв при кімнатній температурі в темряві. Люмінесценцію визначали за допомогою рідера для ELISA WALLAC Victor3 (фірма PerkinElmer2030), тривалість детекції становила 5 с/лунку.

Як продемонстровано на фіг. 31, обидві TCB-молекули індукують перехресне зшивання Т-клітин через CD3 і, як наслідок, Т-клітинну активацію. Her3 TCB виявилась дещо більш ефективною щодо KPL-4-клітин, що можна пояснити більш високим рівнем Her3 відносно Her2 на цих клітинах-мішенях.

Лізис пухлинних клітин, індукований Her2 TCB і Her3 TCB

Оцінювали лізис пухлинних клітин, тобто експресуючих Her2- або Her3 пухлинних клітин-мішеней, відповідними TCB-молекулами, застосовуючи мононуклеарні клітини периферичної крові людини (PBMC) як ефекторні клітини при співвідношенні Е:Т 10:1. Лізис пухлинних клітин визначити, вимірюючи вивільнення ЛДГ в супернатанти через 24 і 48 год. після інкубації з зазначеними TCB.

Людські PBMC виділяли із свіжої крові або з лейкоцитарної плівки. У цілому, метод полягав у наступному: кров розводили 3ФР у співвідношенні 2:1 (свіжа кров) або 3:1 (лейкоцитарна плівка). Приблизно 30 мл суміші кров/3ФР нашаровували на 15 мл Histopaque (фірма Sigma) і центрифугували протягом 30 хв при 450 × g без перерви при КТ. Лімфоцити збирали за допомогою 10-мілілітрової піпетки в 50-мілілітрові пробірки, які містять 3ФР. Пробірки заповнювали до 50 мл 3ФР і центрифугували протягом 10 хв при 350× g. Супернатант відкидали, дебрис ресуспендували в 50 мл 3ФР і центрифугували протягом 10 хв при 300 ×g. Стадію промивання однократно повторювали. Клітини ресуспендували в RPMI, що містить 10 % FCS і 1 % GlutaMax (глутамакс) (фірма Life Technologies) і зберігали при 37 °С, 5 % CO₂ в інкубаторі аж до початку аналізу (не більше 24 год.).

Клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 30000 клітин/лунку в плоскодонні 96-лункові планшети. Клітин давали прикріпитися у вологій камері. В день аналізу планшети центрифугували при 350 × g протягом 5 хв і середовище видаляли аспірацією. Добавляли по 100 мкл на лунку середовища для аналізу.

TCB добавляли в зазначених концентраціях (діапазон 0,001пМ - 1нМ для Her3 TCB і 0,01пМ - 100нМ для Her2 TCB, три повторності). PBMC добавляли до клітин-мішеней в кінцевому співвідношенні Е:Т 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали через 24 і 48 год. після інкубації шляхом кількісного визначення ЛДГ (лактатдегідрогеназа), що вивільнилася в клітинні супернатанти з апоптозних/некротизованих клітин (набір для детекції ЛДГ, фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) одержували шляхом інкубації клітин-мішеней з Тритоном Х-100 в концентрації 1 %. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав спільній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без біспецифічного антитіла. Величини EC₅₀ розраховували за допомогою програми GraphPadPrism5.

В іншому експерименті лізис пухлинних клітин визначали за активністю каспази 3/7 через 6,5 год. шляхом вимірювання люмінесценції в рідері для мікропланшетів (час зчитування 5 с на

лунку).

Для визначення активності каспази 3/7 клітини-мішені KPL-4-caspase-3/7 GloSensor (KPL-4, стабільно трансфектовані плазмідною GloSensor) збирали відповідно до описаного вище методу. Після одного промивання 3ФР концентрацію доводили до $0,3 \times 10^6$ клітин/мл у середовищі для аналізу (RPMI1640, 2 % FCS, 1 % Glutamax) і змішували з 2 об. % реагенту GloSensor цАМФ (фірма Promega). 100 мкл (= 30000 клітин) зазначеної суспензії клітин-мішеней переносили в кожну лунку 96-лункового плоскодонного планшета з білими стінками.

Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) одержували шляхом центрифугування в градієнті густини Histopaque збагачених лімфоцитами препаратів (лімфоцитарні плівки), одержаних зі здорових донорів відповідно до описаного вище методу. Аналіз лізису пухлинних клітин здійснювали у цілому відповідно до описаного вище методу.

Результати, представлені на фіг. 32B і фіг. 33, ілюструють, що Her3 TCB-молекула індукує ефективний і залежний від концентрації апоптоз і лізис пухлинних клітин KPL-4.

Це ж виявлено і для Her2 TCB і на фіг. 32A і Б проілюстрований виражений і залежний від концентрації лізис пухлинних клітин з плином часу. При цьому величини EC_{50} , які характеризують цитоліз, ймовірно, залежать від рівня експресії Her2 на відповідній клітині-мішені. Чим вище рівень експресії, тим вище цитоліз пухлинних клітин за допомогою Her2 TCB.

Приклад 4

Одержання біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, "(Fab)₂-CrossFab" з модифікаціями зарядів і без них (анти-MCSP/анти-CD3)

Схематичне зображення молекул, одержаних в цьому прикладі, представлено на фіг. 34. Молекула анти-MCSP/анти-CD3 "(Fab)₂-CrossFab" з модифікаціями зарядів в зв'язувальних MCSP компонентах (позначена в даному прикладі як "(Fab)₂-XFab-LC007cv") містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 58, 59 і 60. Молекула анти-MCSP/анти-CD3 "(Fab)₂-CrossFab" без модифікацій зарядів (позначена в даному прикладі як "(Fab)₂-XFab") містить відповідні амінокислотні послідовності без модифікацій зарядів.

Молекули одержували, очищали і аналізували практично відповідно до методів, описаних вище в прикладі 1, з наступними адаптаціями.

Для одержання зазначених молекул клітини HEK293-EBNA трансфектували відповідними експресійними векторами у співвідношенні 1:2:1 ("вектор важкого ланцюга": "вектор легкого ланцюга анти-MSCP Fab": "вектор легкого ланцюга анти-CD3 Fab").

Концентрацію конструкцій в культуральному середовищі визначали за допомогою білокA-PXBP на основі зв'язування ділянок CH1-домену з білком А при рН 8,0 і стадії елюції з рН 2,5 відповідно до методу, описаного в прикладі 1.

Білки, що секретуються, очищали з супернатантів клітинних культур за допомогою афінної хроматографії, використовуючи афінну хроматографію, основану на зв'язуванні з CH1, з наступною стадією гель-фільтрації.

Для здійснення афінної хроматографії супернатант завантажували в колонку HiTrap КарраSelect (CV=5 мл, фірма GE Healthcare), врівноважену 5 мл буфера, що містить 50мМ Трис, 100мМ гліцин, 150мМ NaCl, рН 8,0. Незв'язаний білок видаляли промиванням, використовуючи об'єм, кратний принаймні 10 об'ємам колонки, буфера, що містить 50мМ Трис, 100мМ гліцин, 150мМ NaCl, рН 8,0. Необхідний білок елюювали, використовуючи в об'ємі, кратному 10 об'ємам колонки, градієнт до 50мМ Трис, 100мМ гліцин, 150мМ NaCl, рН 2,0. Білковий розчин нейтралізували, додаючи 1/40 2М Трис, рН 8,0. Необхідний білок концентрували і фільтрували перед завантаженням в колонку HiLoad Superdex 200 (фірма GE Healthcare), врівноважену буфером, що містить 20мМ гістидин, 140мМ хлорид натрію, 0,01 % Твін-20, рН 6,0.

Обидві молекули одержували і очищали за допомогою однакового методу. У порівнянні з молекулою без модифікацій зарядів "(Fab)₂-XFab" титр молекули з зарядами виявився в 10 разів більш низьким. Однак кінцевий вихід виявився приблизно в 2 рази вище для молекули з модифікаціями зарядів в двох анти-MCSP Fab "(Fab)₂-XFab-LC007cv" (таблиця 18). Молекулу (Fab)₂-XFab-LC007cv можна очищати з одержанням кінцевого вмісту мономера 95,8 % за даними гель-фільтрації і, як встановлено за допомогою аналізу методом KE-ДСН, кінцева чистота становила 94,33 %.

Таблиця 18

Узагальнення даних про одержання і очистку анти-MCSP/анти-CD3 TCB-молекул з модифікаціями зарядів і без модифікацій зарядів

Молекула	Титр [мг/л]	Вихід [%]	Вихід [мг/л]	Аналітична SEC (HMW/мономер/LMW) [%]
(Fab)2-XFab	25	6,24	7,8	0/100/0
(Fab)2-XFab-LC007cv	2,32	10,5	0,24	3,2/95,8/1

Таблиця 19

Результати КЕ-ДСН аналізів (невідновні умови) анти-MCSP/анти-CD3 TCB-молекули з модифікаціями зарядів

Молекула	Пік, №	Розмір [кДа]	Чистота [%]
(Fab)2-XFab-LC007cv	1	162,67	94,33
	2	170,59	5,67

Зв'язування з клітинами біспецифічних антитіл, які активують Т-клітини, "(Fab)₂-CrossFab" з модифікаціями зарядів і без них (анти-MCSP/анти-CD3)

Клітини Jurkat з суспензійної культури збирали, однократно промивали FACS-буфером (3ФР + 0,1 % БСА) і визначали життєздатність за допомогою пристрою ViCell.

Прикріплені пухлинні клітини MV-3 збирали з використанням буфера для дисоціації клітин (фірма Gibco Invitrogen) і однократно промивали FACS-буфером перед визначенням життєздатності за допомогою пристрою ViCell.

Висівали по 0,2 млн клітин на лунку круглодонного 96-лункового планшета і планшети центрифугували протягом 4 хв при 400× g. Потім до клітин добавляли по 25 мкг на лунку розведень первинних антитіл в FACS-буфері. Клітини інкубували протягом 30 хв в холодильнику. Потім клітини двічі промивали, використовуючи 150 мкл FACS-буфера на лунку.

25 мкл розведеного вторинного антитіла (кон'югований з ФІТЦ F(ab')₂-фрагмент козячого антилюдського IgG AffiniPure, F(ab')₂-фрагмент специфічного, фірма Jackson ImmunoResearch) добавляли в лунку і планшети забарвлювали протягом ще 30 хв при 4°C в темряві.

Планшети промивали двічі, використовуючи 150 мкл FACS-буфера на лунку, і ресуспендували в 150 мкл FACS-буфера. Аналіз здійснювали за допомогою пристрою BD FACS Cantoll, забезпеченого програмою FACS Diva. Будували графік залежності величин медіанної інтенсивності флуоресценції (MFI) від концентрації молекул MCSP TCB.

Як продемонстровано на фіг. 36, для молекули (Fab)2-XFab-LC007cv виявлено залежне від концентрації зв'язування з людським MCSP на MV-3-клітинах і з людським CD3 на Jurkat-клітинах. Для молекули (Fab)2-XFab без модифікацій зарядів виявлено зв'язування з людським MCSP, порівнянне з (Fab)2-XFab-LC007cv (величина EC₅₀, що характеризує зв'язування, становила 2,3нМ для (Fab)2-XFab-LC007cv, а для (Fab)2-XFab величина EC₅₀ становила 1,5нМ.

Лізис пухлинних клітин, опосередкований біспецифічними антитілами "(Fab)₂-CrossFab", які активують Т-клітини, з модифікаціями зарядів і без них (анти-MCSP/анти-CD3)

Лізис пухлинних клітин, тобто експресуючих MCSP пухлинних клітин-мішеней лінії MV-3, індукований молекулами MCSP TCB вивчали з використанням людських РВМС як ефекторних клітин за співвідношенні Е:Т 10:1. Лізис пухлинних клітин визначити, вимірюючи вивільнення ЛДГ в супернатанти через 24 і 48 год. після інкубації з ТCB.

У цілому, метод полягав у наступному: клітини-мішені збирали за допомогою трипсину/ЕДТК, промивали і висівали з густиною 25000 клітин/лунку в плоскодонні 96-лункові планшети. Клітинам давали прикріпитися протягом ночі у вологій камері. В день аналізу планшети центрифугували при 350 × g протягом 5 хв і середовище видаляли аспірацією. Добавляли по 100 мкл на лунку середовища для аналізу.

Мононуклеарні клітини периферичної крові (РВМС) виділяли зі свіжої крові. У цілому, метод полягав у наступному: кров розводили в співвідношенні 2:1 за допомогою 3ФР. Приблизно 30 мл суміші кров/3ФР нашаровували на 15 мл Histopaque (фірма Sigma) і центрифугували протягом 30 хв при 450 × g без перерви. Лімфоцити збирали за допомогою 10-мілілітрової піпетки в 50-мілілітрові пробірки, які містять 3ФР. Пробірки заповнювали до 50 мл 3ФР і

центрифугували протягом 10 хв при 350× g. Супернатант відкидали, дебрис ресуспендували в 50 мл 3ФР і центрифугували протягом 10 хв при 300 ×g. Стадію промивання однократно повторювали. Клітини ресуспендували в RPMI, що містить 10 % FCS і 1 % GlutaMax (фірма Life Technologies) і зберігали при 37 °C, 5 % CO₂ в інкубаторі аж до початку аналізу (не більше 24 год.).

Для аналізу цитолізу ТСВ-молекули добавляли в зазначених концентраціях (діапазон 0,04пМ - 10нМ, три повторності). РВМС добавляли до клітин-мішеней в кінцевому співвідношенні Е:Т 10:1. Цитоліз клітин-мішеней оцінювали через 24 і 48 год. після інкубації шляхом кількісного визначення ЛДГ (лактатдегідрогеназа), що вивільнилася в клітинні супернатанти з апоптозних/некротизованих клітин (набір для детекції ЛДГ, фірма Roche Applied Science, № 11 644 793 001). Максимальний лізис клітин-мішеней (= 100 %) одержували шляхом інкубації клітин-мішеней з Тритоном Х-100 в концентрації 1 %. Мінімальний лізис (= 0 %) відповідав спільній інкубації клітин-мішеней з ефекторними клітинами без біспецифічного антитіла. Величини ЕС₅₀ розраховували за допомогою програми GraphPadPrism5.

Як продемонстровано на фіг. 37, для обох молекул виявлений залежний від концентрації лізис експресуючих hMCSP-клітин-мішеней. Ефективність молекули (Fab)2-XFab-LC007cv (ЕС₅₀ 2,8пМ через 24 год. і 8,6пМ через 48 год.) виявилась порівнянною з ефективністю молекули (Fab)2-XFab без модифікацій зарядів (ЕС₅₀ 5,9пМ через 24 год. і 4,8пМ через 48 год.).

Хоча вище винахід описано достатньо докладно за допомогою ілюстрацій і прикладів, наведених для цілей кращого його розуміння, опис і приклади не повинні розглядатися як такі, що обмежують обсяг винаходу. Всі процитовані в даному описі патентні і наукові публікації повністю включені в нього як посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Ф.ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ

<120> БІСПЕЦИФІЧНІ АНТИГЕНЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ МОЛЕКУЛИ, ЯКІ АКТИВУЮТЬ Т-КЛІТИНИ

<130> P32209

<150> EP 14179764.7

<151> 2014-08-04

<150> EP 15170866.6

<151> 2015-06-05

<160> 73

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp

UA 124254 C2

	65		70		75		80									
	His	Leu	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr
					85					90					95	
5	Val	Cys	Tyr	Pro	Arg	Gly	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Asn	Phe	Tyr	Leu
				100					105					110		
10	Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	Val	Cys	Glu	Asn	Cys	Met	Glu	Met	Asp	Val	Met
			115					120					125			
	Ser	Val	Ala	Thr	Ile	Val	Ile	Val	Asp	Ile	Cys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu
		130					135					140				
15	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Lys	Asn	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys
	145					150					155					160
	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn
					165					170					175	
20	Lys	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Arg
				180					185					190		
25	Lys	Gly	Gln	Arg	Asp	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Gln	Arg	Arg	Ile	
		195						200					205			
	<210>	2														
	<211>	198														
	<212>	PRT														
30	<213>	Macaca fascicularis														
	<400>	2														
35	Met	Gln	Ser	Gly	Thr	Arg	Trp	Arg	Val	Leu	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser
	1				5					10					15	
	Ile	Gly	Val	Trp	Gly	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Ser	Ile	Thr
			20						25					30		
40	Gln	Thr	Pro	Tyr	Gln	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr
			35					40					45			
	Cys	Ser	Gln	His	Leu	Gly	Ser	Glu	Ala	Gln	Trp	Gln	His	Asn	Gly	Lys
		50					55					60				
45	Asn	Lys	Glu	Asp	Ser	Gly	Asp	Arg	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Phe	Ser	Glu
	65					70					75					80
	Met	Glu	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Val	Cys	Tyr	Pro	Arg	Gly	Ser	Asn	Pro
					85					90					95	
50	Glu	Asp	Ala	Ser	His	His	Leu	Tyr	Leu	Lys	Ala	Arg	Val	Cys	Glu	Asn
				100					105					110		
55	Cys	Met	Glu	Met	Asp	Val	Met	Ala	Val	Ala	Thr	Ile	Val	Ile	Val	Asp
			115					120					125			
	Ile	Cys	Ile	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Lys
		130					135					140				
60	Asn	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly

UA 124254 C2

	145	150						155							160				
	Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn 165 170 175																		
5	Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly 180 185 190																		
10	Leu Asn Gln Arg Arg Ile 195																		
	<210>	3																	
	<211>	125																	
	<212>	PRT																	
15	<213>	Штучна послідовність																	
	<220>																		
	<223>	CD3 VH																	
20	<400>	3																	
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15																		
25	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr 20 25 30																		
	Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45																		
30	Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp 50 55 60																		
	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr 65 70 75 80																		
	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr 85 90 95																		
40	Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe 100 105 110																		
	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120 125																		
45	<210>	4																	
	<211>	5																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Штучна послідовність																	
50	<220>																		
	<223>	CD3 HCDR1																	
	<400>	4																	
55	Thr Tyr Ala Met Asn 1 5																		
	<210>	5																	
60	<211>	19																	
	<212>	PRT																	

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CD3 HCDR2
 5 <400> 5
 Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 10 Val Lys Gly
 <210> 6
 15 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 20 <223> CD3 HCDR3
 <400> 6
 His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 30 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CD3 VL
 35 <400> 7
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
 35 40 45
 45 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
 50 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 55 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 8
 <211> 14
 60 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CD3 LCDR1
 5 <400> 8
 Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10
 10 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> CD3 LCDR2
 <400> 9
 20 Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CD3 LCDR3
 30 <400> 10
 Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 1 5
 35 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> лінкер
 <400> 11
 45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 50 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> лінкер
 <400> 12
 60 Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 13
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 15 35 40 45
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 20 65 70 75 80
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95
 25
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125
 30
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 35
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175
 40
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205
 45
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220
 50
 Pro
 225
 <210> 14
 <211> 690
 55
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CD20 VH-CH1-CD3 VH-CL-Fc (виступ, P329G LALA)
 60
 <400> 14

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1				5					10					15		
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	
				20					25					30			
	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
15	65					70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
20	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
25	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
30	145					150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
35	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
40	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	
		210					215					220					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	
45	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	
				245						250					255		
50	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	
				260					265					270			
	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	
			275					280					285				
55	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	
		290					295					300					
	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	
60	305					310					315					320	

	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	
					325					330					335		
5	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				340					345					350			
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	
			355					360					365				
10	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	
		370					375					380					
	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	
	385					390					395					400	
15	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	
					405					410					415		
	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	
20				420					425					430			
	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	
			435					440					445				
25	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	
		450					455					460					
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	
	465					470					475					480	
30	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
					485					490					495		
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
35				500					505					510			
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			515					520					525				
40	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
		530					535					540					
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	545					550				555						560	
45	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	
					565					570					575		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
50				580					585					590			
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			595					600					605				
55	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
		610					615					620					
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	625					630					635					640	
60	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	

	645	650	655
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	660	665	670
5	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	675	680	685
	Ser Pro		
10	690		
	<210> 15		
	<211> 447		
	<212> PRT		
15	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CD20 VH-CH1-Fc (западина, P329G LALA)		
20	<400> 15		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1 5 10 15		
25	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
	20 25 30		
	Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35 40 45		
30	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
35	65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
40	Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100 105 110		
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
	115 120 125		
45	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
	130 135 140		
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
50	145 150 155 160		
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
	165 170 175		
55	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
	180 185 190		
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
	195 200 205		
60	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		

UA 124254 C2

	210		215		220											
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
5	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
					245					250					255	
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
10				260					265					270		
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
			275					280					285			
15	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320
20	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
					325					330					335	
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr
25				340					345					350		
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser
			355					360					365			
30	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
		370					375					380				
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
	385					390					395					400
35	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
					405					410					415	
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
40				420					425					430		
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445			
45	<210>	16														
	<211>	214														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
50	<220>															
	<223>	CD3 VL-CH1														
	<400>	16														
55	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
				20					25					30		
60	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly

UA 124254 C2

		35		40		45											
		Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
		50						55					60				
5		Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala
		65					70					75				80	
		Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
10					85						90				95		
		Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala
					100					105					110		
15		Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
				115					120					125			
		Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
20				130				135					140				
		Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
		145					150					155				160	
		Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
25					165					170					175		
		Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
				180						185					190		
30		Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
				195					200					205			
		Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys										
		210															
35		<210>	17														
		<211>	219														
		<212>	PRT														
		<213>	Штучна послідовність														
40		<220>															
		<223>	CD20	VL-CL													
		<400>	17														
45		Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
		1				5					10					15	
		Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
50				20					25					30			
		Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
				35					40					45			
55		Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro
		50						55					60				
		Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
		65				70						75				80	
60		Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn

UA 124254 C2

	85	90	95
	Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	110
5	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
	115	120	125
	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
10	130	135	140
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	145	150	155
15	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170	175
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
20	180	185	190
	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	195	200	205
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
25	210	215	
	<210> 18		
	<211> 672		
	<212> PRT		
30	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (виступ, P329G LALA)		
35	<400> 18		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1	5	10
	15		
40	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
	20	25	30
	Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
45	35	40	45
	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
50	65	70	75
	80		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
55	Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100	105	110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
60	115	120	125
	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		

UA 124254 C2

	130				135				140							
5	Gly 145	Cys	Leu	Val	Glu	Asp 150	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 155	Val	Thr	Val	Ser	Trp 160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 165	Thr	Ser	Gly	Val	His 170	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu 175
10	Gln	Ser	Ser	Gly 180	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 185	Ser	Val	Val	Thr	Val 190	Pro	Ser
	Ser	Ser	Leu 195	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 200	Ile	Cys	Asn	Val	Asn 205	His	Lys	Pro
15	Ser	Asn 210	Thr	Lys	Val	Asp	Glu 215	Lys	Val	Glu	Pro	Lys 220	Ser	Cys	Asp	Gly
	Gly 225	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly 230	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala 235	Val	Val	Thr	Gln	Glu 240
20	Pro	Ser	Leu	Thr 245	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr 250	Val	Thr	Leu	Thr	Cys 255	Gly
	Ser	Ser	Thr	Gly 260	Ala	Val	Thr	Thr	Ser 265	Asn	Tyr	Ala	Asn 270	Trp	Val	Gln
25	Glu	Lys 275	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg 280	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly 285	Thr	Asn	Lys
	Arg 290	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala 295	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser 300	Leu	Leu	Gly	Gly
30	Lys 305	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu 310	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro 315	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu 320
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu 325	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu 330	Trp	Val	Phe	Gly	Gly 335	Gly
40	Thr	Lys	Leu	Thr 340	Val	Leu	Ser	Ser	Ala 345	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro 350	Ser	Val
	Phe	Pro	Leu 355	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys 360	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly 365	Thr	Ala	Ala
45	Leu 370	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp 375	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro 380	Val	Thr	Val	Ser
	Trp 385	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu 390	Thr	Ser	Gly	Val	His 395	Thr	Phe	Pro	Ala	Val 400
50	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly 405	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser 410	Ser	Val	Val	Thr	Val 415	Pro
	Ser	Ser	Ser	Leu 420	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr 425	Ile	Cys	Asn	Val	Asn 430	His	Lys
55	Pro	Ser	Asn 435	Thr	Lys	Val	Asp	Lys 440	Lys	Val	Glu	Pro	Lys 445	Ser	Cys	Asp
	Lys	Thr 450	His	Thr	Cys	Pro	Pro 455	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 460	Ala	Ala	Gly	Gly

	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	465					470					475					480	
5	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
					485					490					495		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				500					505					510			
10	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			515					520					525				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
15			530				535					540					
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
	545				550						555					560	
20	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
					565					570					575		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				580					585					590			
25	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			595					600					605				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
30			610				615					620					
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	625					630					635					640	
35	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
					645					650					655		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				660					665					670			
40	<210>	19															
	<211>	447															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
45	<220>																
	<223>	CD20 VH-CH1(EE)-Fc (западина, P329G LALA)															
	<400>	19															
50	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	
55				20					25					30			
	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
60	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
		50					55					60					

	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
5	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		85	90	95
	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		100	105	110
10	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		115	120	125
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu		130	135	140
15	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp		145	150	155
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu		165	170	175
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser		180	185	190
25	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro		195	200	205
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		210	215	220
30	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro		225	230	235
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		245	250	255
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		260	265	270
40	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		275	280	285
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		290	295	300
45	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		305	310	315
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		325	330	335
50	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr		340	345	350
55	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser		355	360	365
	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		370	375	380
60																				

	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	385	390	395	400
5	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	405	410	415	
	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	420	425	430	
10	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		435	440	445	
	<210> 20																			
	<211> 219																			
15	<212> PRT																			
	<213> Штучна послідовність																			
	<220>																			
	<223> CD20 VL-CL(RK)																			
20	<400> 20																			
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	1	5	10	15
25	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	20	25	30	
	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	35	40	45	
30	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro	50	55	60	
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	65	70	75	80
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn	85	90	95	
40	Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	100	105	110	
	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	115	120	125	
45	Lys	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	130	135	140	
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	145	150	155	160
	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	165	170	175	
55	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	180	185	190	
	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	195	200	205	
60																				

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 21
 5 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 10 <223> CD3 VH-CL

<400> 21

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

25 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

30 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

35 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140

40 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175

45 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190

50 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220

55 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 22
 60 <211> 687
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> BCMA VH-CH1-CD3 VH-CL-Fc (виступ, P329G LALA)

5

<400> 22

	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
10	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
15			35					40					45				
	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
25	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
				100					105					110			
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
30			115					120					125				
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130					135					140					
35	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
					165					170					175		
40	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
				180					185					190			
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
45			195					200					205				
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	
		210					215					220					
50	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	
					245					250					255		
55	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
				260					265					270			
	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	
60			275					280					285				

	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	
	290						295					300					
5	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	
	305					310					315					320	
	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	
					325					330					335		
10	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				340					345					350			
	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	
			355					360					365				
15	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	
	370						375					380					
	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	
20	385					390					395					400	
	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	
					405					410					415		
25	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	
				420					425					430			
	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	
		435						440					445				
30	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	
	450						455					460					
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	
35	465					470					475					480	
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
					485					490					495		
40	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				500					505					510			
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		515						520					525				
45	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
	530						535					540					
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
50	545					550				555						560	
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
					565					570					575		
55	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				580					585					590			
	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	
			595					600					605				
60	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	

UA 124254 C2

	610	615	620
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
	625	630	635 640
5	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
		645 650 655	
10	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
		660 665 670	
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
		675 680 685	
15	<210> 23		
	<211> 444		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
20	<220>		
	<223> BCMA VH-CH1-Fc (западина, P329G LALA)		
	<400> 23		
25	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
		20 25 30	
30	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
		35 40 45	
	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
35		50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
		65 70 75 80	
40	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
		85 90 95	
	Ala Lys Val Leu Gly Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
		100 105 110	
45	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala		
		115 120 125	
	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
50		130 135 140	
	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
		145 150 155 160	
55	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
		165 170 175	
	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
		180 185 190	
60	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		

UA 124254 C2

	195						200						205					
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		
	210						215					220						
5	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
	225					230					235					240		
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
10					245					250					255			
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
				260					265					270				
15	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
			275					280					285					
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	290						295					300						
20	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
	305					310					315					320		
	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
25					325					330					335			
	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro		
				340					345					350				
30	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val		
			355					360					365					
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
	370						375					380						
35	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		
	385					390					395					400		
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp		
40					405					410					415			
	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His		
				420					425				430					
45	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro						
			435					440										
	<210> 24																	
	<211> 214																	
50	<212> PRT																	
	<213> Штучна послідовність																	
	<220>																	
	<223> CD3 VL-CH1																	
55	<400> 24																	
	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly		
	1				5					10					15			
60	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser		

UA 124254 C2

	20	25	30
	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly		
5	35	40	45
	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe		
	50	55	60
10	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala		
	65	70	75
	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		
	85	90	95
15	Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala		
	100	105	110
	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser		
20	115	120	125
	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe		
	130	135	140
25	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly		
	145	150	155
	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu		
	165	170	175
30	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr		
	180	185	190
	Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys		
	195	200	205
35	Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210		
40	<210> 25		
	<211> 216		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
45	<220>		
	<223> BCMA VL-CL		
	<400> 25		
50	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1	5	10
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser		
	20	25	30
55	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
	35	40	45
	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
60	50	55	60
	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		

UA 124254 C2

	65					70					75					80	
5	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Pro	
					85					90					95		
	Asp	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	
					100					105					110		
10	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	
					115					120					125		
	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	
					130					135					140		
15	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	
					145					150					155		
	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	
					165					170					175		
20	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	
					180					185					190		
	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	
					195					200					205		
25	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
					210					215							
30	<210>	26															
	<211>	669															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
35	<220>																
	<223>	BCMA VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (виступ, P329G LALA)															
	<400>	26															
40	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1					5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
					20					25					30		
45	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
					35					40					45		
	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
					50					55					60		
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
					65					70					75		
55	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
					100					105					110		
60	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	

UA 124254 C2

		115					120					125				
5	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
	130						135					140				
	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145					150					155					160
10	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
					165					170					175	
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180					185					190		
15	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly
20	210						215					220				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu
	225					230					235					240
25	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr
					245					250					255	
	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
				260					265					270		
30	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro
			275					280					285			
	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala
35	290						295					300				
	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys
	305					310					315					320
40	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu
					325					330					335	
	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
				340					345					350		
45	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
			355					360					365			
	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
50	370						375					380				
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
	385					390					395					400
55	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
					405					410					415	
	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
				420					425					430		
60	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
	435							440					445			

	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
	450						455					460					
5	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
	465					470					475					480	
	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
					485					490					495		
10	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
				500					505					510			
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
15			515				520						525				
	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
	530					535					540						
20	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
	545				550					555						560	
	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
				565			570						575				
25	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	
				580				585					590				
	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
30			595				600					605					
	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
	610				615						620						
35	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
	625				630					635						640	
	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
				645			650					655					
40	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro				
				660			665										
	<210>	27															
45	<211>	444															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
50	<223>	BCMA VH-CH1(EE)-Fc (западина, P329G LALA)															
	<400>	27															
	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
55	1			5						10				15			
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20			25						30				
60	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35				40				45							

	Ser	Ala	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55						60					
5	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
10	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
				100					105					110			
	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
15			115					120					125				
	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
		130					135					140					
20	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
				165					170						175		
25	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
			180					185						190			
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
30			195					200					205				
	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
		210					215					220					
35	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				245					250						255		
40	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				260					265					270			
	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
45			275					280					285				
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	
		290					295					300					
50	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
	305					310					315					320	
	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				325					330						335		
55	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	
				340					345					350			
	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	
60			355					360					365				

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 5 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 10 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440
 15
 <210> 28
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 20
 <220>
 <223> CD3 VH-CL
 <400> 28
 25
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 35 40 45
 35 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 40 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 45 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
 115 120 125
 50 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 130 135 140
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 145 150 155 160
 55 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 165 170 175
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 180 185 190
 60

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 195 200 205
 5 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230
 10 <210> 29
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> BCMA VL-CL(RK)
 <400> 29
 20 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 25 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 30 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 35 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Asp Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110
 40 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 45 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 50 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 55 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 60

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> CD20 VH
 <400> 30
 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 15 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 20 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 30 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 35 <210> 31
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> CD20 VL
 <400> 31
 45 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 50 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 55 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 60 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

5 Arg Thr Val
115

<210> 32
<211> 672
10 <212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD3 VL-CH1-CD20 VH-CH1 (EE)-Fc (виступ, P329G LALA)
15 <400> 32

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

20 Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

25 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

30 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

35 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

40 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

45 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

50 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
55 195 200 205

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220

60 Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
225 230 235 240

	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	
					245					250					255		
5	Ser	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	
				260					265					270			
	Met	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	
			275					280					285				
10	Phe	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	
		290					295					300					
	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
15	305				310					315					320		
	Cys	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				325						330					335		
20	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
				340					345					350			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
			355					360					365				
25	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
		370					375					380					
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
30	385				390						395					400	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
					405					410					415		
35	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				420					425					430			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
			435					440					445				
40	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
		450					455					460					
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
45	465				470						475					480	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
					485					490					495		
50	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				500					505					510			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			515					520					525				
55	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		530					535					540					
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
60	545				550						555					560	

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 565 570 575
 5 Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 580 585 590
 Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 595 600 605
 10 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 610 615 620
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 625 630 635 640
 15 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 645 650 655
 20 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 660 665 670
 <210> 33
 <211> 672
 <212> PRT
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CD20 VH-CH1-CD3 VL-CH1-Fc(виступ, P329G LALA)
 30 <400> 33
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 35 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 40 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 45 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 55 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 60 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
5	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
10	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	
		210					215					220					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	
15		225				230					235					240	
	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	
					245					250					255		
	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	
20				260					265					270			
	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	
			275					280					285				
25	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	
		290					295					300					
	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	
30		305				310					315					320	
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	
					325					330					335		
	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
35				340					345					350			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
			355					360					365				
40	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
		370					375					380					
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
45		385				390					395					400	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
					405					410					415		
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
50				420					425					430			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
			435					440					445				
55	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
		450					455					460					
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
60		465				470					475					480	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	

	485								490				495				
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				500					505					510			
5	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			515					520					525				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
10		530					535					540					
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
	545					550					555					560	
15	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
					565					570					575		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
20				580					585					590			
	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			595					600					605				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
25		610					615					620					
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	625					630					635					640	
30	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
					645					650					655		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
35				660					665					670			
	<210>	34															
	<211>	676															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
40																	
	<220>																
	<223>	CD20	VH-CH1	CD3	VL-CL-Fc	(виступ,	P329G	LALA)									
	<400>	34															
45																	
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	
50				20					25					30			
	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
55	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
	50						55					60					
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
60																	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	

UA 124254 C2

				85					90					95			
	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
5	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
10		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
15	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
20				180					185					190			
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	
25		210					215					220					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	
	225					230					235					240	
30	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	
				245						250					255		
	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	
35				260					265					270			
	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	
			275					280					285				
	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	
40		290					295					300					
	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	
	305					310					315					320	
45	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	
				325						330					335		
	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	
50				340					345					350			
	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	
			355					360					365				
	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	
55		370					375					380					
	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	
	385					390					395					400	
60	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	
				405						410					415		

	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	
				420					425					430			
5	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	
			435					440					445				
	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
		450					455					460					
10	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
	465					470					475					480	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
15				485						490					495		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
				500					505					510			
20	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
			515					520					525				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
25		530					535					540					
	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	
	545					550					555					560	
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
30				565						570					575		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	
				580					585					590			
35	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	
			595					600					605				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	
40		610					615					620					
	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	
	625					630					635					640	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	
45				645						650					655		
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
				660					665					670			
50	Ser	Leu	Ser	Pro													
			675														
	<210>	35															
	<211>	228															
55	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	CD3 VH-CH1															
60	<400>	35															

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 20 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125
 25 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 35 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205
 40 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys
 225
 <210> 36
 <211> 681
 <212> PRT
 50 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> CD20 VL-CH1-CD3 VH-CH1 (EE)-Fc (виступ, P329G LALA)
 55 <400> 36
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 60 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
5	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
10	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn	
					85					90					95		
	Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
15				100					105					110			
	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	
			115					120					125				
20	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	
		130					135						140				
	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	
	145					150					155					160	
25	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	
					165					170					175		
	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
30				180					185					190			
	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	
			195					200					205				
35	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		210					215					220					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	
	225					230					235					240	
40	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	
					245					250					255		
	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	
45				260					265					270			
	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	
			275					280					285				
50	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	
		290					295					300					
	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
	305					310					315					320	
55	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	
					325					330					335		
	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
60				340					345					350			

	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	
					355				360				365				
5	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	
		370					375					380					
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
	385					390					395					400	
10	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
					405					410					415		
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	
				420					425					430			
15	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
			435					440					445				
	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
20		450					455					460					
	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
	465					470					475					480	
25	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
					485					490					495		
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
				500					505					510			
30	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
			515					520					525				
	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
35		530					535					540					
	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
	545					550					555					560	
40	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	
					565					570					575		
	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	
				580					585					590			
45	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	
			595					600					605				
	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	
50		610					615					620					
	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	625					630					635					640	
55	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
					645					650					655		
	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	
				660					665					670			
60	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro								

675 680

<210> 37
 <211> 442
 5 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CD20 VL-CH1-Fc(западина, P329G LALA)
 10 <400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 20 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 25 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 30 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125
 35 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 130 135 140
 40 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 45 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 50 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220
 55 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 60 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe

UA 124254 C2

	260	265	270
	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
5	275	280	285
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
	290	295	300
10	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
	305	310	315
	Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala		
	325	330	335
15	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
	340	345	350
	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly		
20	355	360	365
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
	370	375	380
25	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
	385	390	395
	Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
	405	410	415
30	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
	420	425	430
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
35	435	440	
	<210> 38		
	<211> 215		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
40			
	<220>		
	<223> CD3 VL-CL(KK)		
	<400> 38		
45			
	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
	1	5	10
	Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
50	20	25	30
	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly		
	35	40	45
55	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala		
60	65	70	75
	Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn		

UA 124254 C2

				85					90					95			
	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
				100					105					110			
5	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Lys	Leu	
			115					120					125				
10	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr	Pro	
		130					135					140					
	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	Lys	Ala	
	145					150					155					160	
15	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	Ala	
					165					170					175		
	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	Arg	
				180					185					190			
20	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Thr	
			195					200					205				
25	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser										
		210					215										
	<210> 39																
	<211> 226																
	<212> PRT																
30	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
	<223> CD20 VH-CL																
35	<400> 39																
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1				5					10					15		
40	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	
				20					25					30			
	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
45	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
50	65					70					75					80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
55	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
60	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	

	130		135		140												
	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
5	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	
					165					170					175		
10	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	
				180					185					190			
	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	
			195					200					205				
15	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	
		210					215					220					
	Glu	Cys															
	225																
20	<210>	40															
	<211>	672															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
25	<220>																
	<223>	CD20	VH-CH1	(EE)	-CD3	VL-CH1	-Fc	(DD,	P329G	LALA)							
	<400>	40															
30	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser	
35				20					25					30			
	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
40	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
		50					55					60					
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
45	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
50				100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
55	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
60	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	

UA 124254 C2

				165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
5																
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
10	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly
		210					215					220				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu
	225					230					235					240
15																
	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly
					245					250					255	
	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln
20				260					265					270		
	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys
			275					280					285			
25	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly
		290					295					300				
	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu
	305					310					315					320
30																
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly
					325					330					335	
	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
35				340					345					350		
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
			355					360					365			
40	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
		370					375					380				
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
	385					390					395					400
45																
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
					405					410					415	
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
50				420					425					430		
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
			435					440					445			
55	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
		450					455					460				
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
	465					470					475					480
60																
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
					485					490					495	

	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				500					505					510		
5	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
			515					520					525			
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
		530					535					540				
10	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu
	545					550					555					560
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
15					565					570					575	
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				580					585					590		
20	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
			595					600					605			
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asp	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
25		610					615					620				
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Thr	Val	Asp
	625					630					635					640
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
30					645					650					655	
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				660					665					670		
35	<210>	41														
	<211>	447														
	<212>	PRT														
	<213>	Штучна послідовність														
40	<220>															
	<223>	CD20 VH-CH1 (EE)-Fc (KK, P329G LALA)														
	<400>	41														
45	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser
				20					25					30		
50	Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
	Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe
55		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
60	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	

	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
5	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
10	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
15					165					170					175		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
20	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
25		210					215					220					
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
30					245					250					255		
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
35	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
			275					280					285				
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
40		290					295					300					
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
45					325					330					335		
	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				340					345					350			
50	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Lys	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
			355					360					365				
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
		370					375					380					
55	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
	385					390					395					400	
	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
60					405					410					415		

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
5 435 440 445

<210> 42
<211> 447
<212> PRT
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD20 VH-CH1(EE)-Fc(западина, N297G)

15 <400> 42

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

25 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
30 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

40 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
45 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

50 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

55 Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
60 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

5 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

10 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

15 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

25 Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

30 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

35 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

40 <210> 43
<211> 439
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> CD3 VL-CH1-Fc(виступ, N297G)
<400> 43

50 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

55 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

60

	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	
	65					70					75				80		
5	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	
					85					90					95		
	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	
				100					105					110			
10	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	
			115					120					125				
	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	
	130						135					140					
15	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	
	145					150					155					160	
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	
20					165					170					175		
	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	
				180					185					190			
25	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
			195					200					205				
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
	210						215					220					
30	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
	225					230					235					240	
	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
35					245					250					255		
	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
				260					265					270			
40	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
		275						280					285				
	Gln	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
	290						295					300					
45	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
	305					310					315					320	
	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
50					325					330					335		
	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	
				340					345					350			
55	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
			355					360					365				
	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
	370						375					380					
60	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	

385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

5 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
10 435

<210> 44
<211> 450
<212> PRT
15 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> CD20 VH-CH1(EE)-Fc(западина, N297G)

20 <400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

30 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
35 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

40 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

45 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
50 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

55 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

60 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser

UA 124254 C2

	210		215		220												
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
	225					230					235					240	
5	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
					245					250					255		
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
10				260					265					270			
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			275					280					285				
15	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Thr	
		290					295					300					
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
20	305					310					315					320	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
					325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
25				340					345					350			
	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			355					360					365				
30	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
		370					375					380					
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
35	385					390					395					400	
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	
				405						410					415		
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
40				420					425					430			
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
			435					440					445				
45	Ser	Pro															
		450															
	<210>	45															
	<211>	213															
50	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	CD20 VL-CL(RK)															
55	<400>	45															
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
60	1				5					10					15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	

UA 124254 C2

	20	25	30
	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr		
	35	40	45
5	Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
	50	55	60
10	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		
	65	70	75
	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr		
	85	90	95
15	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
	100	105	110
	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr		
	115	120	125
20	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	130	135	140
25	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
	145	150	155
	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170	175
30	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180	185	190
	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	195	200	205
35	Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
40	<210> 46		
	<211> 5		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
45	<220>		
	<223> CD20 HCDR1		
	<400> 46		
50	Tyr Ser Trp Ile Asn		
	1	5	
	<210> 47		
	<211> 17		
	<212> PRT		
55	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CD20 HCDR2		
60	<400> 47		

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CD20 HCDR3

15 <400> 48

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
 1 5 10

20 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> CD20 LCDR1

<400> 49

30 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> CD20 LCDR2

40 <400> 50

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

45 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

50 <220>
 <223> CD20 LCDR3

<400> 51

55 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 52
 60 <211> 673
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Her2 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc(виступ, P329G LALA)

5

<400> 52

10	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	20	25	30	
15	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45	
	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val	50	55	60	
20	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95	
25	Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	100	105	110	
30	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	115	120	125	
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	130	135	140	
35	Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	145	150	155	160
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	165	170	175	
40	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	180	185	190	
45	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	195	200	205	
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	210	215	220	
50	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln	225	230	235	240
	Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys	245	250	255	
55	Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val	260	265	270	
60	Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn	275	280	285	

	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	
	290						295					300					
5	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	
	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	
					325					330					335		
10	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
				340					345					350			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
			355					360					365				
15	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	370						375					380					
20	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
	385					390					395					400	
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
					405					410					415		
25	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				420					425					430			
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
			435					440					445				
30	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	450						455					460					
35	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
	465					470					475					480	
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
					485					490					495		
40	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
				500					505					510			
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
			515					520					525				
45	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	530						535					540					
50	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
	545					550					555					560	
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
					565					570					575		
55	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
				580					585					590			
	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
			595					600					605				
60	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	

	610	615	620
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	625	630	635 640
5	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
		645 650	655
10	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
		660 665	670
	Pro		
15	<210> 53		
	<211> 448		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
20	<220>		
	<223> Her2 VH-CH1 (EE)-Fc (западина, P329G LALA)		
	<400> 53		
25	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr		
		20 25 30	
30	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
		35 40 45	
	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val		
35		50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
		65 70 75 80	
40	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
		85 90 95	
	Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln		
		100 105 110	
45	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
		115 120 125	
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
50		130 135 140	
	Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
		145 150 155 160	
55	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
		165 170 175	
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
		180 185 190	
60	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		

UA 124254 C2

	195						200						205																	
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp														
	210						215						220																	
5	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly														
	225						230						235																	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile														
10							245						250																	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu														
							260						265																	
													270																	
15	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His														
							275						280																	
													285																	
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg														
							290						295																	
20													300																	
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys														
							305						310																	
													315																	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu														
25							325						330																	
													335																	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys														
							340						345																	
													350																	
30	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu														
							355						360																	
													365																	
	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp														
							370						375																	
35													380																	
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val														
							385						390																	
													395																	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp														
40							405						410																	
													415																	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His														
							420						425																	
													430																	
45	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro														
							435						440																	
													445																	
	<210> 54																													
	<211> 214																													
50	<212> PRT																													
	<213> Штучна послідовність																													
	<220>																													
	<223> Her2 VL-CL(RK)																													
55	<400> 54																													
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly														
	1						5						10																	
60													15																	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala														

UA 124254 C2

	20	25	30
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
5	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
10	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
	65	70	75
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro		
	85	90	95
15	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100	105	110
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly		
	115	120	125
20	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
	130	135	140
	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
25	145	150	155
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
	165	170	175
30	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
35	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 55		
40	<211> 673		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
45	<223> CD3 VL-CH1-Her3 VH-CH1(EE)-Fc(виступ, P329G LALA)		
	<400> 55		
	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
50	1	5	10
	Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser		
	20	25	30
55	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly		
	35	40	45
	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Thr Pro Ala Arg Phe		
	50	55	60
60	Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu Ser Gly Ala		

UA 124254 C2

	65				70				75				80			
	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
					85					90					95	
5	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala
				100					105					110		
	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser
10			115					120					125			
	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe
		130					135					140				
15	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly
	145					150					155					160
	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu
					165					170					175	
20	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr
				180					185					190		
	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys
25			195					200					205			
	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		210					215					220				
30	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly
		225				230					235					240
	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Arg	Ser
					245					250					255	
35	Ser	Tyr	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp
				260					265					270		
	Met	Gly	Trp	Ile	Tyr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys
40			275					280					285			
	Leu	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala
		290					295					300				
45	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
	305					310					315					320
	Cys	Ala	Arg	His	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Leu	Thr	Tyr	Trp	Gly
					325					330					335	
50	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
				340					345					350		
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
55			355					360					365			
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
		370					375					380				
60	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
						390					395					400

	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
					405					410					415		
5	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				420					425					430			
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
			435					440					445				
10	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
		450					455					460					
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
15	465					470					475					480	
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
					485					490					495		
20	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
				500					505					510			
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
			515					520					525				
25	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
		530					535					540					
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
30	545					550					555					560	
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
					565					570					575		
35	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
				580					585					590			
	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
			595					600					605				
40	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
		610					615					620					
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
45	625					630					635					640	
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
					645					650					655		
50	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				660					665					670			
	Pro																
55	<210>	56															
	<211>	448															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
60	<220>																

<223> Her3 VH-CH1(EE)-Fc(западина, P329G LALA)

<400> 56

5	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Arg	Ser	Ser	
				20					25					30			
10	Tyr	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
	Gly	Trp	Ile	Tyr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Leu	
15		50					55					60					
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
	Ala	Arg	His	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Leu	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
25	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
30		130					135					140					
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
35	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
40	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
45		210					215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
50	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250					255		
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
55	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
60		290					295					300					

	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
5	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	
				340					345					350			
10	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
15	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
20					405				410						415		
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
25	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
	<210>	57															
	<211>	220															
30	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	Her3 VL-CL															
35	<400>	57															
	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
40	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Asn	Ser	
				20					25					30			
	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	
45			35					40					45				
	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val	
		50				55						60					
50	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	
	65					70					75					80	
	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	
					85					90					95		
55	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	
				100					105					110			
	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	
60			115					120					125				

Arg Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140
 5 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 10 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 15 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220
 <210> 58
 20 <211> 664
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 25 <223> MCSP VH-CH1 (EE) -MCSP VH-CH1 (EE) -CD3 VL-CH1
 <400> 58
 30 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 35 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 40 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 50 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr
 130 135 140
 55 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175
 60

	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
				180					185					190			
5	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	
			195					200					205				
	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
		210					215					220					
10	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	
	225					230					235					240	
	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	
				245						250					255		
15	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	
				260					265					270			
	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Asn	Tyr	Asn	Pro	
20			275						280				285				
	Ser	Leu	Lys	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	
		290					295					300					
25	Phe	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	
	305					310					315					320	
	Tyr	Cys	Ala	Asp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	
					325					330					335		
30	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	
				340					345					350			
	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	
35			355					360					365				
	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	
		370					375					380					
40	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	
	385					390					395					400	
	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	
				405						410					415		
45	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	
				420					425					430			
	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
50			435					440					445				
	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
		450					455					460					
55	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	
	465					470					475					480	
	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	
				485					490						495		
60	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	

UA 124254 C2

				500					505					510			
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
			515					520					525				
5																	
	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	
		530					535					540					
10	Thr	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	
	545					550					555					560	
	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	
					565					570					575		
15																	
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	
				580					585					590			
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
			595					600					605				
20																	
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
		610					615					620					
25	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	
	625					630					635					640	
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
					645					650					655		
30																	
	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys									
				660													
	<210>	59															
	<211>	229															
35																	
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	CD3 VH-CL															
40																	
	<400>	59															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
45																	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	
				20					25					30			
	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
50			35				40						45				
	Ala	Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
55																	
	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
60																	
	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ser	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	

UA 124254 C2

	100	105	110
	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro		
	115	120	125
5	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
	130	135	140
10	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	145	150	155
	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
	165	170	175
15	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	180	185	190
	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	195	200	205
20	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	210	215	220
25	Asn Arg Gly Glu Cys		
	225		
	<210> 60		
	<211> 214		
	<212> PRT		
30	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> MCSP VL-CL(RK)		
35	<400> 60		
	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
	1	5	10
40	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr		
	20	25	30
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		
	35	40	45
45	Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro		
50	65	70	75
	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp		
	85	90	95
55	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
	100	105	110
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly		
	115	120	125
60	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		

	130		135		140	
	Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn Ala Leu	Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
	145	150	155		160	
5	Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
		165	170		175	
10	Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
		180	185		190	
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser					
		195	200		205	
15	Phe Asn Arg Gly Glu Cys					
	210					
	<210> 61					
	<211> 120					
20	<212> PRT					
	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
	<223> Her2 VH					
25	<400> 61					
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
	1	5	10		15	
30	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr					
		20	25		30	
	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
35		35	40		45	
	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val					
		50	55		60	
40	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr					
		65	70		75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
		85	90		95	
45	Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln					
		100	105		110	
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
50		115	120			
	<210> 62					
	<211> 107					
	<212> PRT					
55	<213> Штучна послідовність					
	<220>					
	<223> Her2 VL					
60	<400> 62					

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	
				20					25					30			
	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
10	Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
15	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
20				100					105								
	<210>	63															
	<211>	120															
	<212>	PRT															
25	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	Her3 VH															
30	<400>	63															
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
35	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Arg	Ser	Ser	
				20					25					30			
	Tyr	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40						45				
40	Gly	Trp	Ile	Tyr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ser	Pro	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Leu	
		50					55					60					
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
45	65					70				75						80	
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95			
50	Ala	Arg	His	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Leu	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120										
55	<210>	64															
	<211>	113															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
60	<220>																

<223> Her3 VL

<400> 64

5 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
20 25 30
10 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
15 50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
20 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
25 Lys

<210> 65

30 <211> 112

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

35 <223> MCSP VH

<400> 65

40 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30
45 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45
Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 50 55 60
Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80
Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
55 85 90 95
Ala Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110
60 <210> 66
<211> 107

<212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> MCSP VL

 <400> 66

 10 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 15 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 67
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> CD3 HCDR2

 <400> 67
 40 Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Asp
 45
 <210> 68
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> CD3 LCDR1

 <400> 68
 55 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
 1 5 10
 60 <210> 69
 <211> 672
 <212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CD20 VH-CH1(E)-CD3 VL-CH1-Fc(виступ, P329G LALA)

5

<400> 69

10	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	1 5 10 15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser	20 25 30
15	Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35 40 45
	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe	50 55 60
20	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65 70 75 80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
25	Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly	100 105 110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	115 120 125
30	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu	130 135 140
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp	145 150 155 160
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu	165 170 175
40	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	180 185 190
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro	195 200 205
45	Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Gly	210 215 220
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu	225 230 235 240
	Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly	245 250 255
55	Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln	260 265 270
	Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys	275 280 285
60		

	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	
	290						295					300					
5	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	
	305					310					315					320	
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	
					325					330					335		
10	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
				340					345					350			
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
			355					360					365				
15	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	370						375					380					
20	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
					405					410					415		
25	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				420					425					430			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
			435					440					445				
30	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	450						455					460					
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
35	465					470					475					480	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
					485					490					495		
40	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				500					505					510			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			515					520					525				
45	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	530						535					540					
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
50	545					550					555					560	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
					565					570					575		
55	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				580					585					590			
	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			595					600					605				
60	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	

	610	615	620
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	625	630	635 640
5	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
		645	650 655
10	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
		660	665 670
	<210> 70		
	<211> 447		
	<212> PRT		
15	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CD20 VH-CH1(E)-Fc(западина, P329G LALA)		
20	<400> 70		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1	5	10 15
25	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
		20	25 30
	Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
		35	40 45
30	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
		50	55 60
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
35	65	70	75 80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
		85	90 95
40	Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
		100	105 110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
		115	120 125
45	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
		130	135 140
	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
50	145	150	155 160
	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
		165	170 175
55	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
		180	185 190
	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
		195	200 205
60	Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		

	210		215		220	
	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro					
	225		230		235	240
5	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser					
		245		250		255
10	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp					
		260		265		270
	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn					
		275		280		285
15	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
		290		295		300
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
	305		310		315	320
20	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys					
		325		330		335
	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr					
25		340		345		350
	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser					
		355		360		365
30	Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
		370		375		380
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
	385		390		395	400
35	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
		405		410		415
	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
40		420		425		430
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro					
		435		440		445
45	<210> 71					
	<211> 219					
	<212> PRT					
	<213> Штучна послідовність					
50	<220>					
	<223> CD20 VL-CL(R)					
	<400> 71					
55	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly					
	1	5		10		15
	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser					
		20		25		30
60	Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser					

	35	40	45
	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro		
	50	55	60
5	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
	65	70	75 80
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn		
10		85	90 95
	Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	110
15	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg		
	115	120	125
	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
20	130	135	140
	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
	145	150	155 160
	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
25		165	170 175
	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
	180	185	190
30	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	195	200	205
	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	
35	<210> 72		
	<211> 672		
	<212> PRT		
	<213> Штучна послідовність		
40	<220>		
	<223> CD20 VH-CH1-CD3 VL-CH1 (EE)-Fc (виступ, P329G LALA)		
	<400> 72		
45	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1	5	10 15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser		
50		20	25 30
	Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40	45
55	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
60	65	70	75 80
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		

UA 124254 C2

	85							90							95		
5	Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
10	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
15	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
20	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
25	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
30	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
35	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
40	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly	
		210					215					220					
45	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	
	225					230					235					240	
50	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	
				245						250					255		
55	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	
				260					265					270			
60	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	
			275					280					285				
65	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	
		290					295					300					
70	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Glu	
	305					310					315					320	
75	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	
				325						330					335		
80	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
				340					345					350			
85	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
			355					360					365				
90	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
		370					375					380					
95	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
	385					390					395					400	
100	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
					405					410					415		

	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				420					425					430			
5	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
			435					440					445				
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
		450					455					460					
10	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	465					470					475					480	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
15					485					490					495		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				500					505					510			
20	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			515					520					525				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		530					535					540					
25	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
	545				550						555					560	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
30					565					570					575		
	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				580					585					590			
35	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			595					600					605				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
		610					615					620					
40	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	625					630					635					640	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
45					645					650					655		
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				660					665					670			
50	<210>	73															
	<211>	232															
	<212>	PRT															
	<213>	Штучна послідовність															
55	<220>																
	<223>	CD3 VH-CL(RK)															
	<400>	73															
60	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

5 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

10 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

15 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

20 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val
115 120 125

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys
130 135 140

25 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

30 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

35 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

40 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

45 1. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, що містить:

(а) першу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном,

(б) другу молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з другим антигеном і в якій варіабельні домени VL і VH легкого ланцюга Fab і важкого ланцюга Fab замінені один на одного,

50 (в) третю молекулу Fab, яка специфічно зв'язується з першим антигеном, і

(г) Fc-домен, який складається з першої і другої субодиниць, що мають здатність до стабільної асоціації,

в якій перший антиген являє собою антиген клітини-мішені, а другий антиген являє собою антиген, який активує Т-клітини; переважно CD3, особливо переважно CD3 епсилон,

55 в якій третя молекула Fab, зазначена у підпункті в), ідентична до першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а),

в якій в константному домені CL першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), та третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в положенні 124 замінена на лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота), та амінокислота в положенні 123 замінена на аргінін (R) або лізин (K) (нумерація відповідно до Кебота), і в якій в константному домені CH1 першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), та третьої молекули Fab, зазначеної у підпункті в), амінокислота в

положенні 147 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота) і амінокислота в положенні 213 замінена на глутамінову кислоту (E) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота); і де Fc-домен являє собою Fc-домен IgG, і в якій в CH3-домени першої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений на амінокислотний залишок, що має

більший об'єм бічного ланцюга, утворюючи тим самим опуклість в CH3-домени першої субодиниці, яка може поміщатися в порожнину в CH3-домени другої субодиниці, і в CH3-домени другої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений на амінокислотний залишок, що має менший об'єм бічного ланцюга, утворюючи тим самим порожнину в CH3-домени другої субодиниці, в яку може поміщатися опуклість в CH3-домени першої субодиниці, і

в якій

I) перша молекула Fab, зазначена у підпункті а), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab другої молекули Fab, зазначеної у підпункті б), і друга молекула Fab, зазначена у підпункті б), і третя молекула Fab, зазначена у підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї із субодиниць Fc-домену, зазначеного у підпункті г), або

II) друга молекула Fab, зазначена у підпункті б), злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем важкого ланцюга Fab першої молекули Fab, зазначеної у підпункті а), і перша молекула Fab, зазначена у підпункті а), і третя молекула Fab, зазначена у підпункті в), кожна злита на С-кінці важкого ланцюга Fab з N-кінцем однієї із субодиниць Fc-домену, зазначеного у підпункті г).

2. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за п. 1, де молекула Fab, яка специфічно зв'язується з CD3, містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 4, CDR 2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 5, CDR 3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 6, CDR 1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 8, CDR 2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 9 і CDR 3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 10.

3. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за пунктом 1 або 2, де молекула Fab, яка специфічно зв'язується з CD3, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 7.

4. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пунктів 1-3, де антиген клітини-мішені являє собою CD20, і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені, містить гіперваріабельну ділянку (CDR) 1 важкого ланцюга SEQ ID NO: 46, CDR 2 важкого ланцюга SEQ ID NO: 47, CDR 3 важкого ланцюга SEQ ID NO: 48, CDR 1 легкого ланцюга SEQ ID NO: 49, CDR 2 легкого ланцюга SEQ ID NO: 50 і CDR 3 легкого ланцюга SEQ ID NO: 51.

5. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пунктів 1-4, де антиген клітини-мішені являє собою CD20 і молекула Fab, яка специфічно зв'язується з антигеном клітини-мішені, містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 30, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, ідентичну до амінокислотної послідовності SEQ ID NO: 31.

6. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пунктів 1-5, в якій перша молекула Fab, зазначена в підпункті а), і третя молекула Fab, зазначена в підпункті в), кожна містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31.

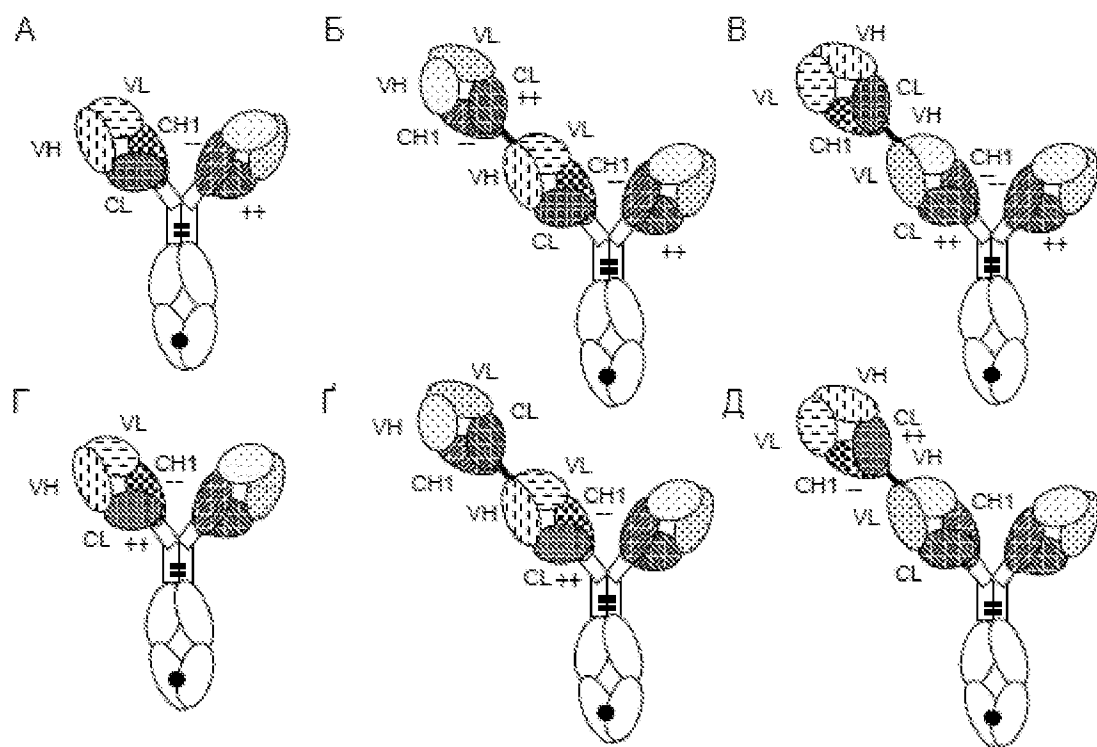
7. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пунктів 1-6, в якій друга молекула Fab, зазначена в підпункті б), містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

8. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-7, в якій Fc-домен являє собою Fc-домен IgG1 або IgG4.

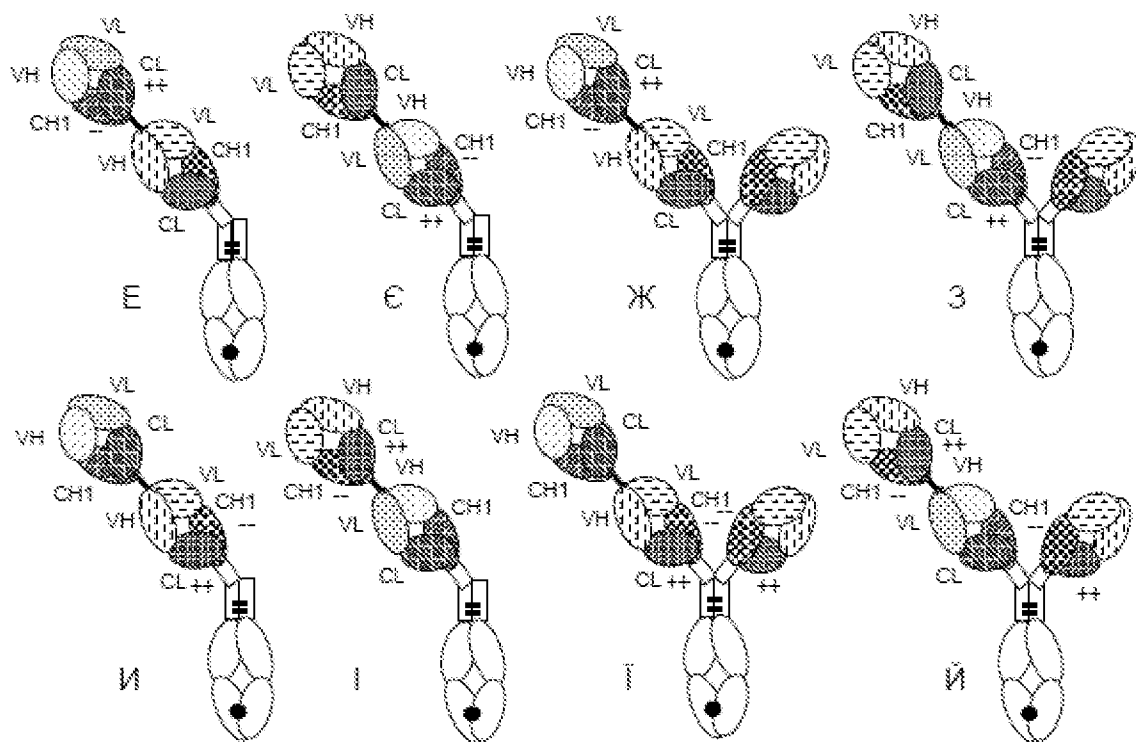
9. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-8, в якій Fc-домен являє собою людський Fc-домен.

10. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-9, в якій зазначений амінокислотний залишок, що має більший об'єм бічного ланцюга, вибраний з групи, що складається з аргініну (R), фенілаланіну (F), тирозину (Y) і триптофану (W), а зазначений амінокислотний залишок, що має менший об'єм бічного ланцюга, вибраний з групи, що складається з аланіну (A), серину (S), треоніну (T) і валіну (V).

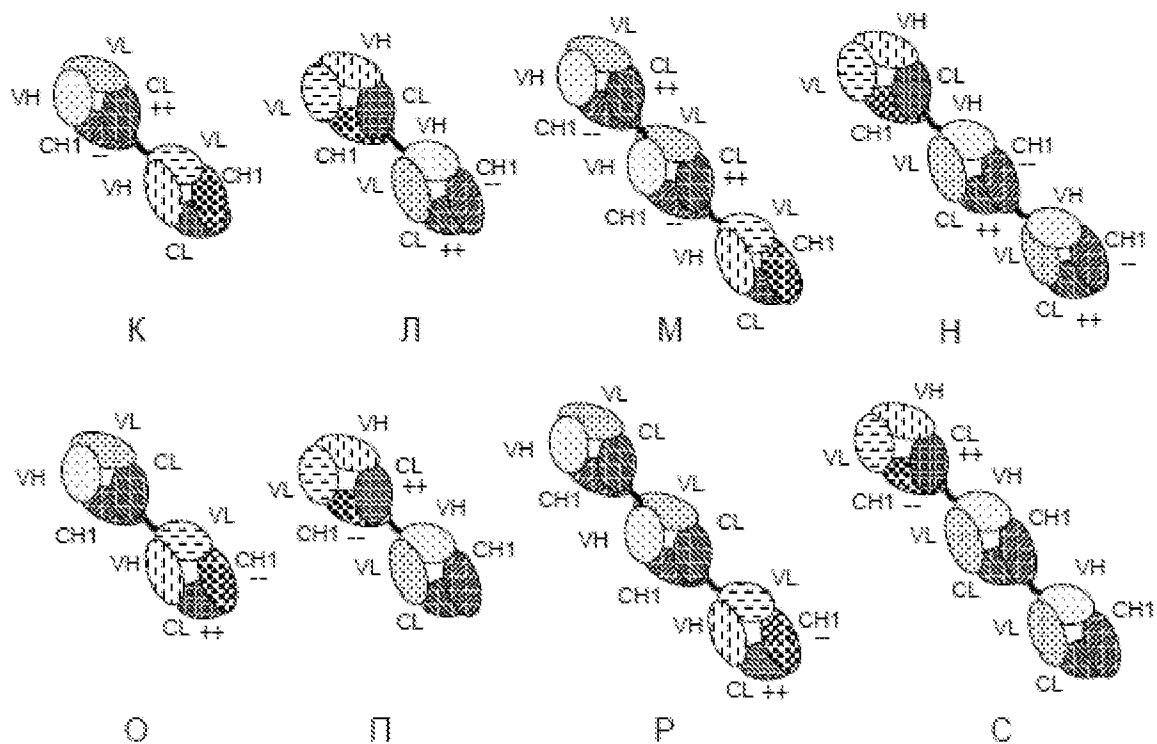
11. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-10, в якій в СН3-доміні першої субодиниці Fc-доміні залишок треоніну в положенні 366 замінений на залишок триптофану (T366W), і в СН3-доміні другої субодиниці Fc-доміні залишок тирозину в положенні 407 замінений на залишок валіну (Y407V), і необов'язково в другій субодиниці Fc-доміні додатково залишок треоніну в положенні 366 замінений на залишок серину (T366S) і залишок лейцину в положенні 368 замінений на залишок аланіну (L368A) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).
12. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-11, в якій в першій субодиниці Fc-доміні додатково залишок серину в положенні 354 замінений на залишок цистеїну (S354C) або залишок глутамінової кислоти в положенні 356 замінений на залишок цистеїну (E356C), а в другій субодиниці Fc-доміні залишок тирозину в положенні 349 додатково замінений на залишок цистеїну (Y349C) (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).
13. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-12, в якій перша субодиниця Fc-доміні містить амінокислотні заміни S354C і T366W, а друга субодиниця Fc-доміні містить амінокислотні заміни Y349C, T366S, L368A і Y407V (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).
14. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-13, в якій Fc-доміні характеризується зниженою афінністю зв'язування з Fc-рецептором і/або зниженою ефекторною функцією у порівнянні з нативним Fc-доміном IgG1.
15. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-14, в якій кожна субодиниця Fc-доміні містить три амінокислотні заміни, які знижують зв'язування з Fc-рецептором і/або ефекторну функцію, де зазначені амінокислотні заміни являють собою L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до EU-індексу Кебота).
16. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-15, де Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор.
17. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-16, де ефекторна функція являє собою антитілообумовлену клітиннозалежну цитотоксичність (ADCC).
18. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-17, де молекула містить принаймні один важкий ланцюг, який ідентичний до послідовності SEQ ID NO: 18, і принаймні один важкий ланцюг, який ідентичний до послідовності SEQ ID NO: 19, і принаймні один легкий ланцюг, який ідентичний до послідовності SEQ ID NO: 20, і принаймні один легкий ланцюг, який ідентичний до послідовності SEQ ID NO: 21.
19. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-18 для застосування як лікарського засобу для лікування раку, що експресує CD20.
20. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-18 для застосування для лікування раку, що експресує CD20, у індивідуума, який потребує цього.
21. Біспецифічна антигензв'язувальна молекула, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-18 для застосування для лікування раку, що експресує CD20, у індивідуума, який потребує цього, де лікування додатково включає введення індивідууму терапевтично ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного агента.
22. Виділений полінуклеотид, що кодує біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-18.
23. Експресійний вектор, що містить полінуклеотид за п. 22.
24. Клітина-хазяїн, яка містить полінуклеотид за п. 22 або вектор за п. 23.
25. Спосіб одержання біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини за пунктом 1 та яка має здатність специфічно зв'язуватися з CD3 і антигеном клітини-мішені, який включає здійснення стадій, на яких а) культивують клітину-хазяїна за п. 24 в умовах, придатних для експресії біспецифічної антигензв'язувальної молекули, яка активує Т-клітини, і б) виділяють біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини.
26. Фармацевтична композиція, яка містить біспецифічну антигензв'язувальну молекулу, яка активує Т-клітини, за будь-яким з пп. 1-18 і фармацевтично прийнятний носій.
27. Фармацевтична композиція за п. 26 для застосування як лікарського засобу для лікування раку, що експресує CD20.
28. Фармацевтична композиція за п. 26 для застосування для лікування раку, що експресує CD20, у індивідуума, який потребує цього.
29. Фармацевтична композиція за п. 26 для застосування для лікування раку, що експресує CD20, у індивідуума, який потребує цього, що додатково включає введення індивідууму терапевтично ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного агента.



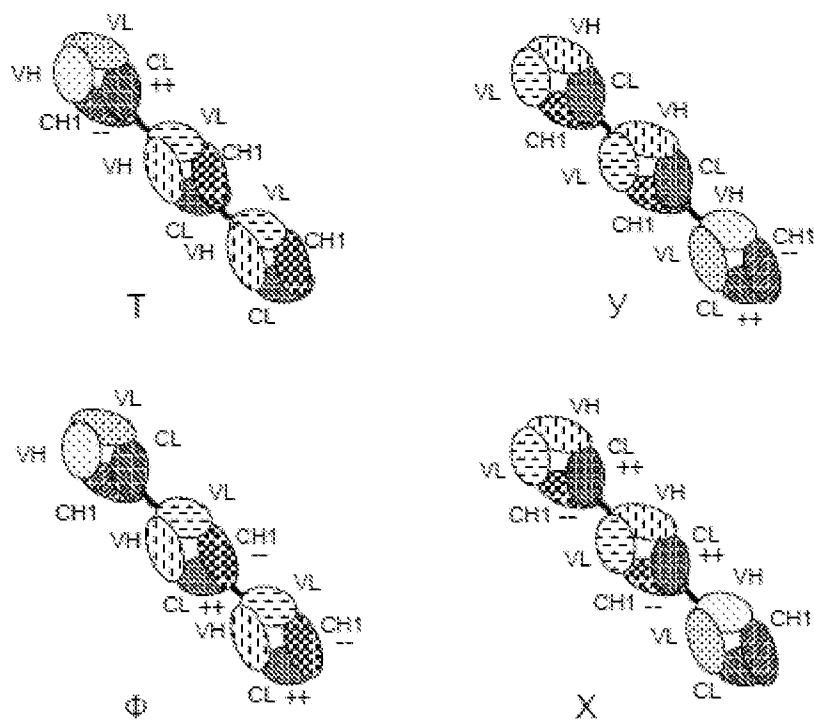
Фиг. 1



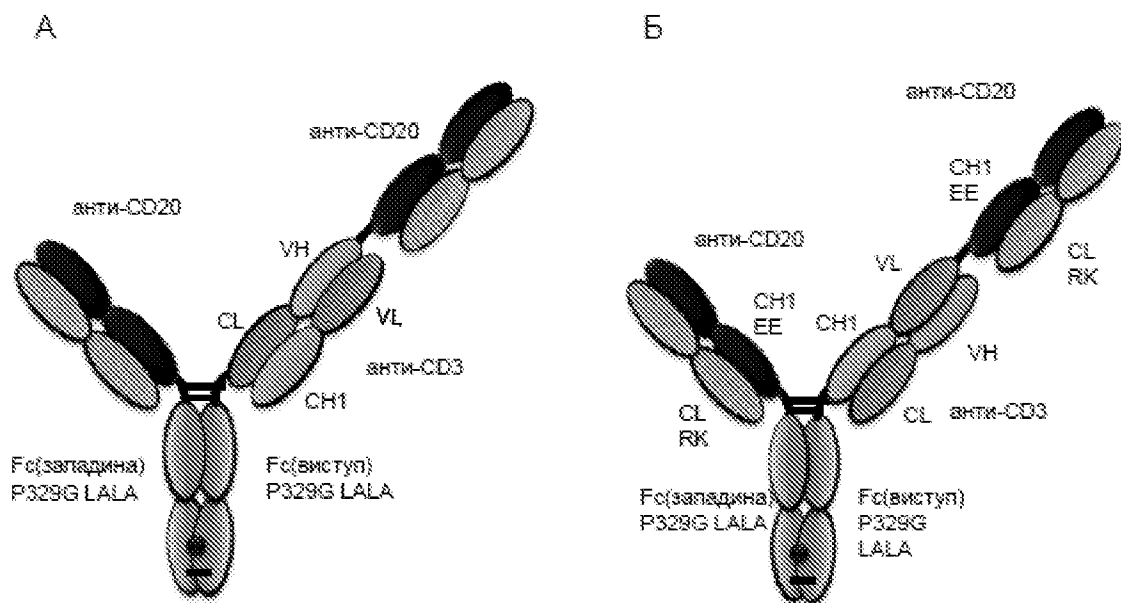
Фиг. 1



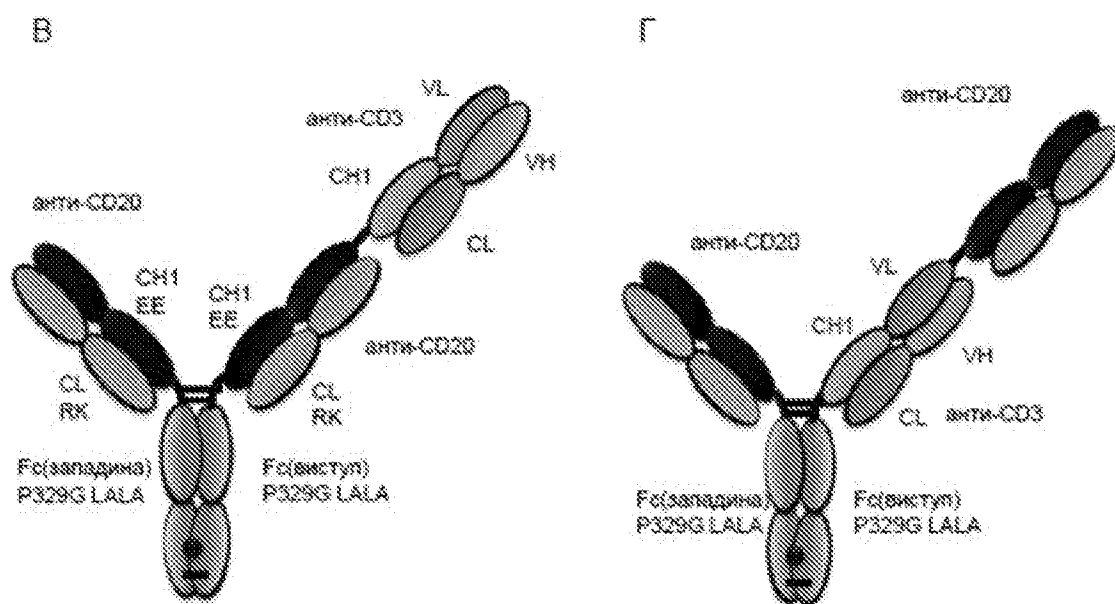
Фиг. 1



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 2

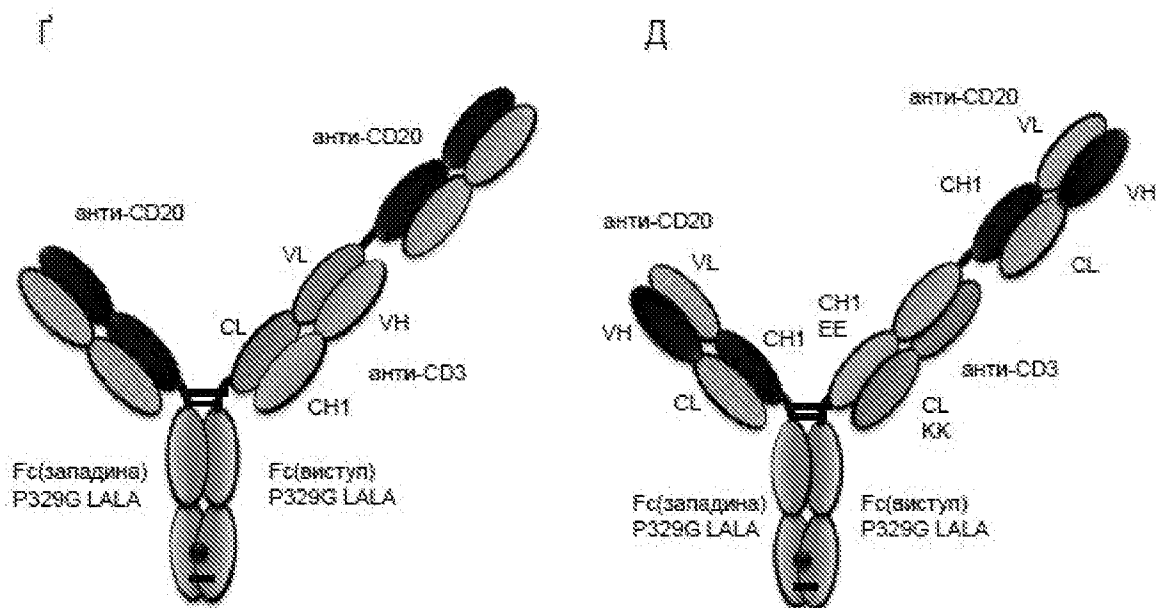


Fig. 2

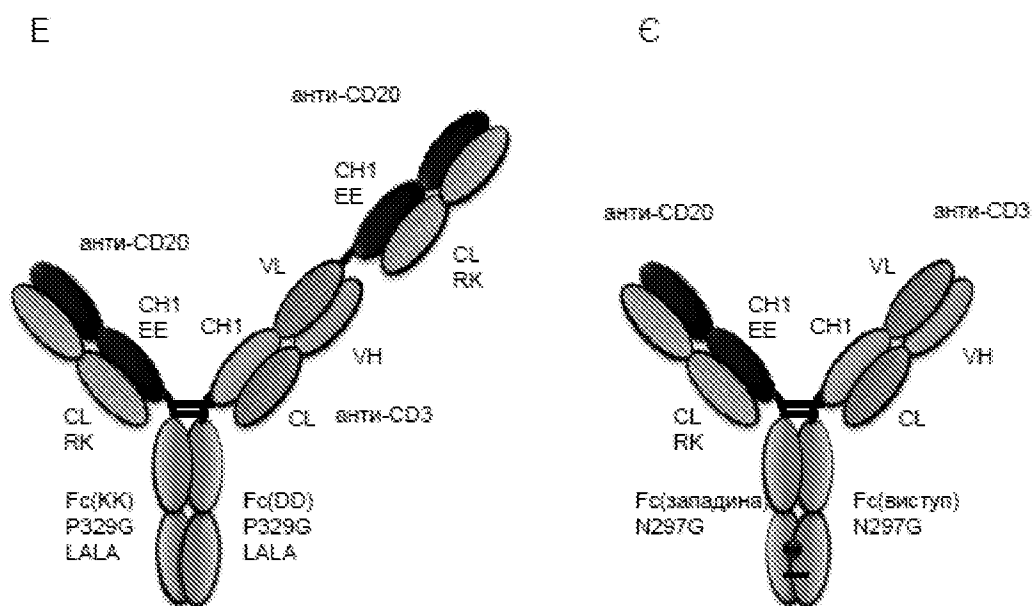
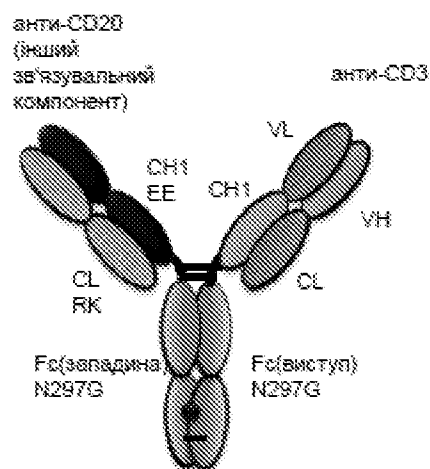


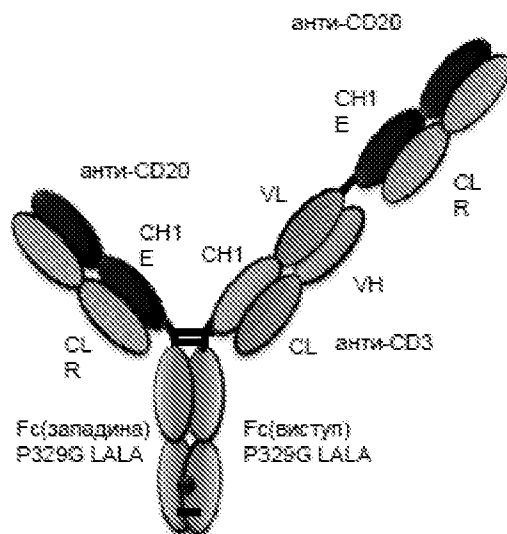
Fig. 2

Ж

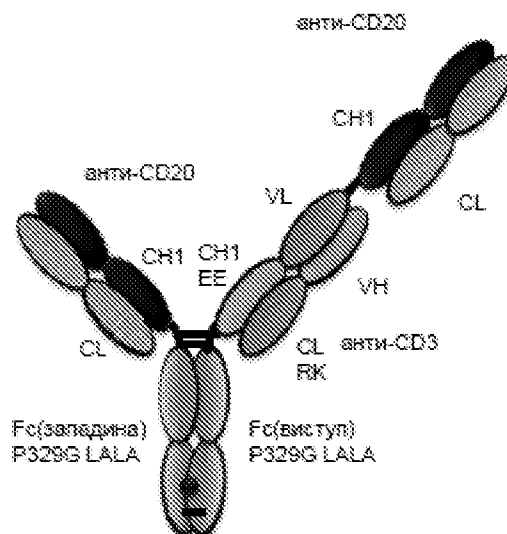


Фіг. 2

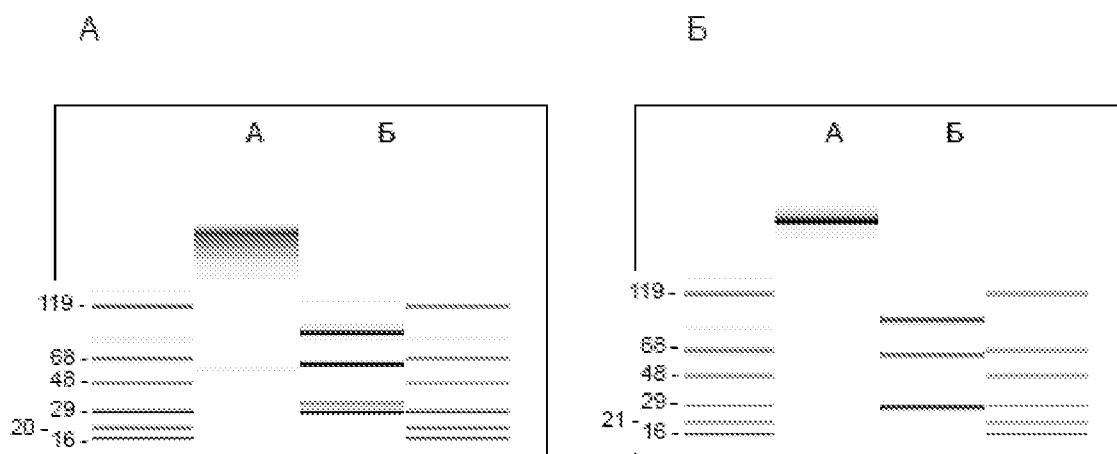
З



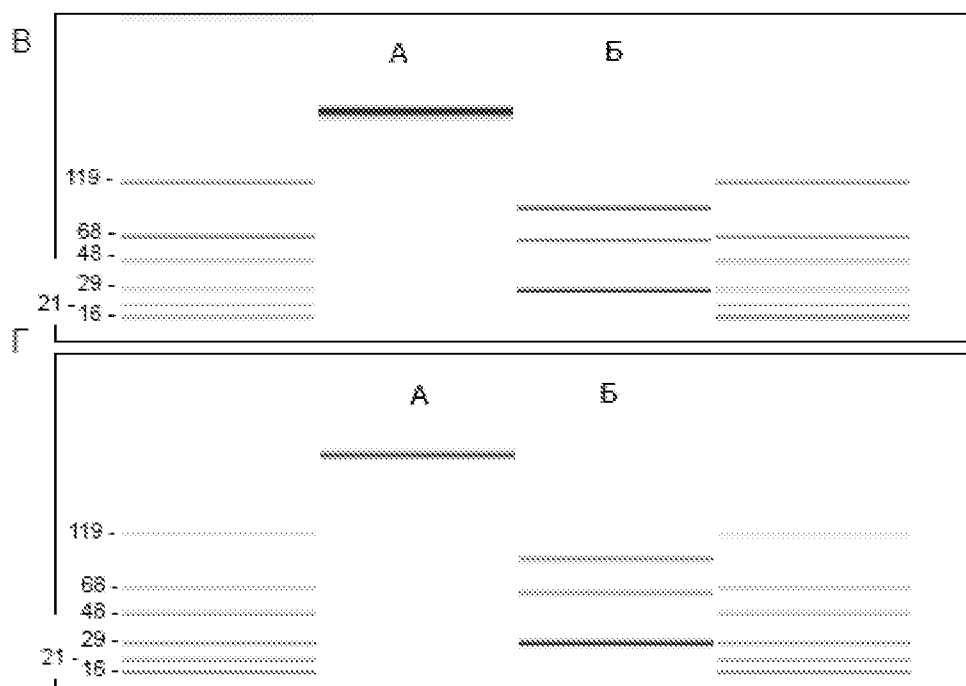
И



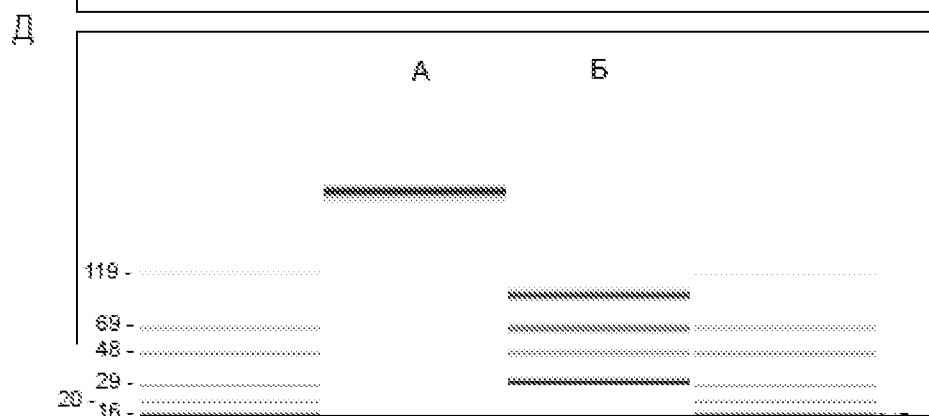
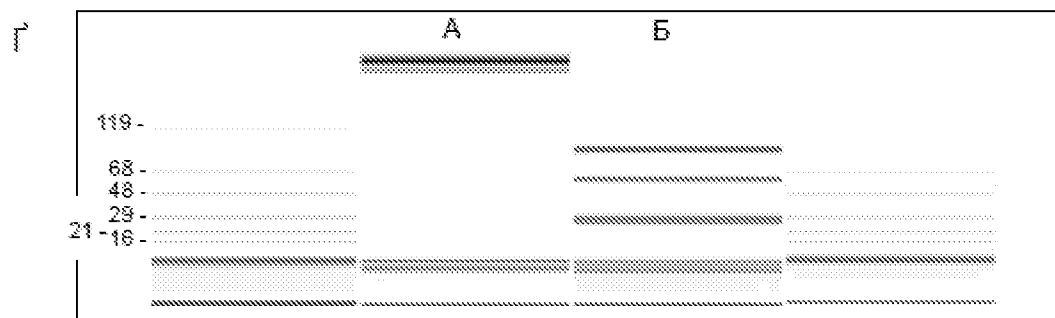
Фіг. 2



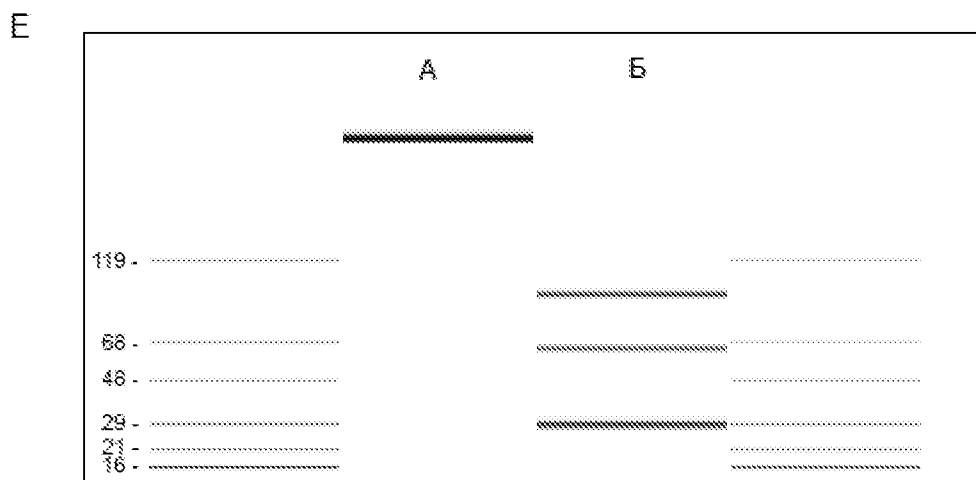
Фиг. 3



Фиг. 3



Фиг. 3



Фиг. 3

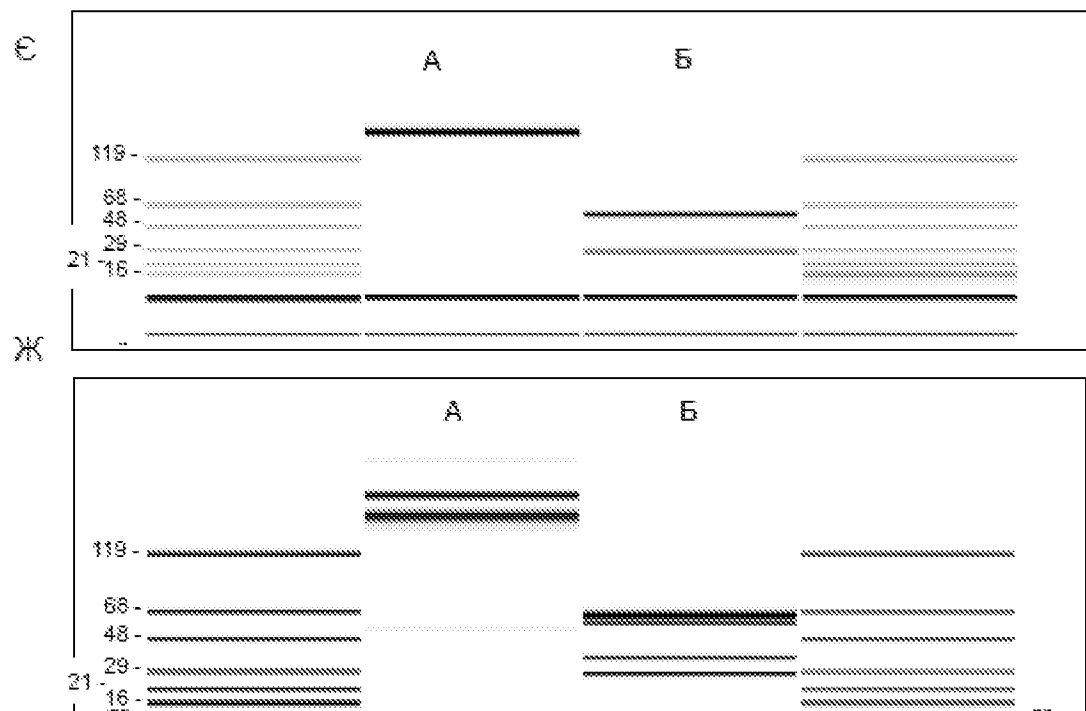


Fig. 3

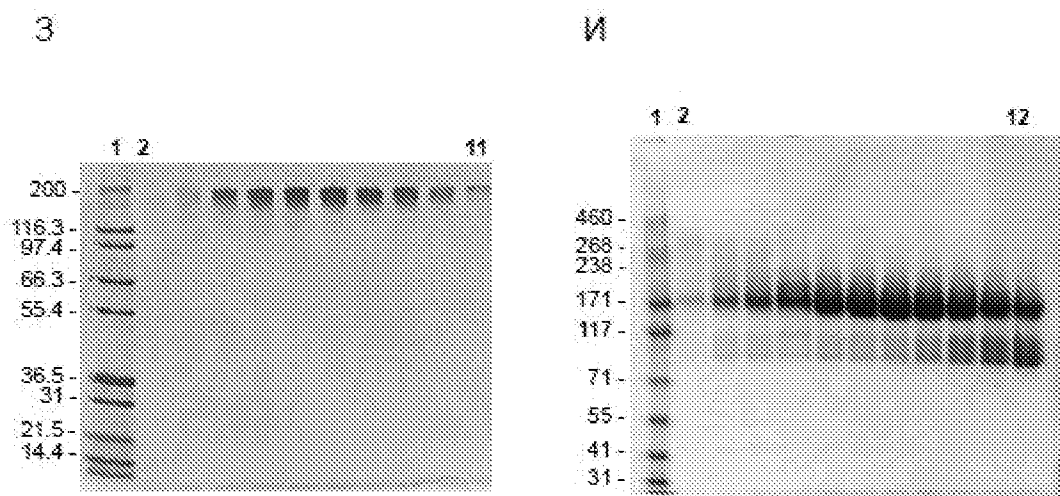
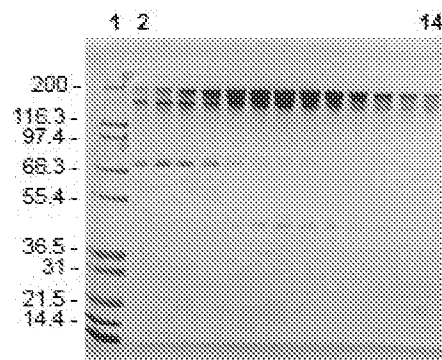
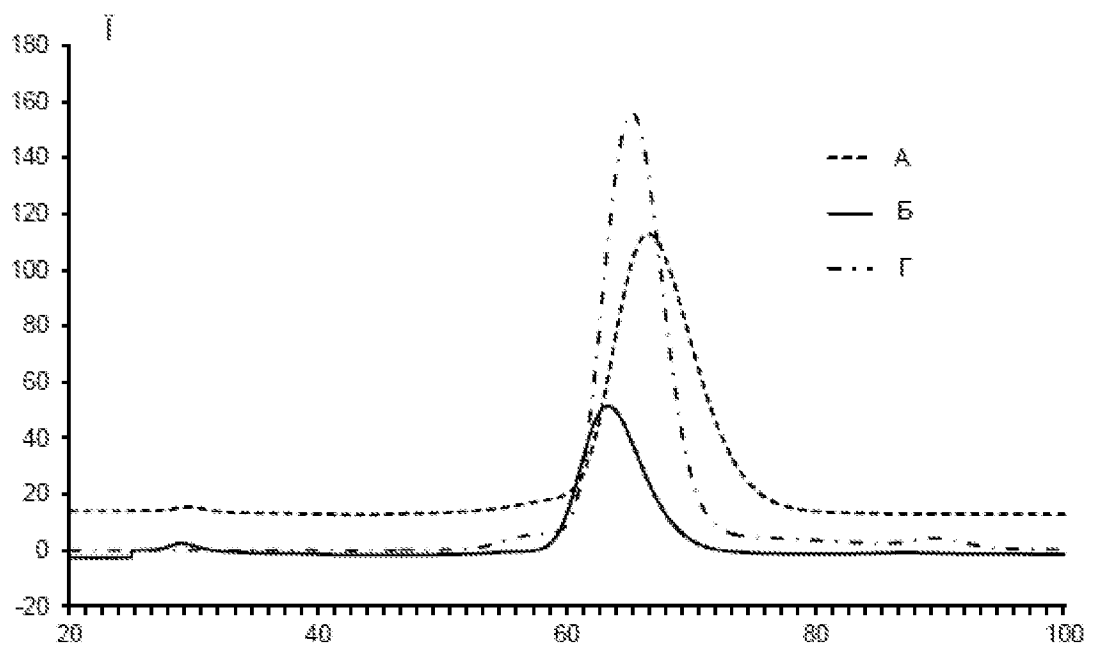


Fig. 3

I



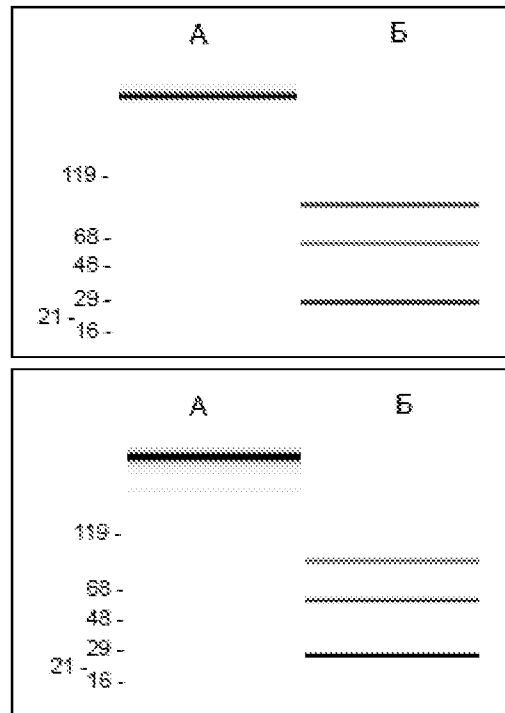
Фиг. 3



Фиг. 3

Й

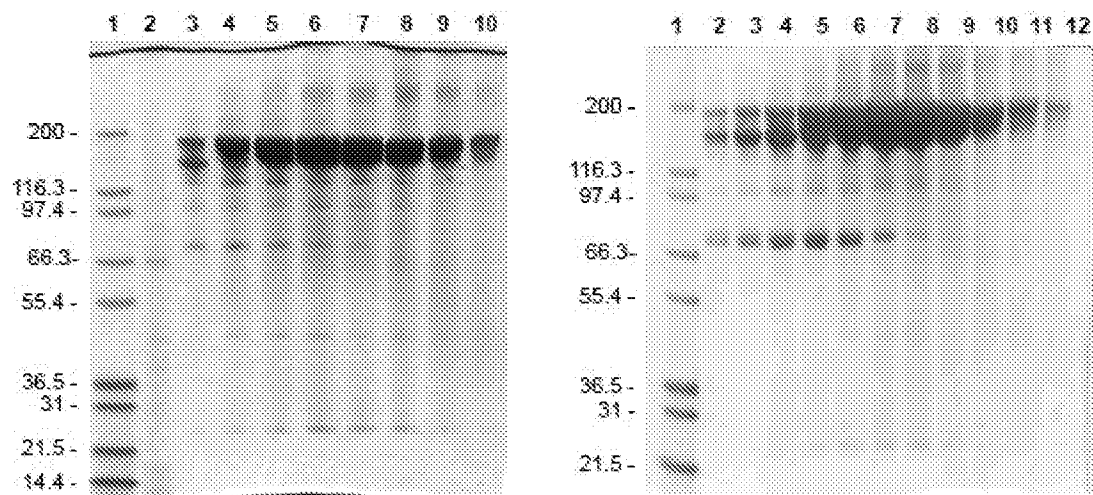
К



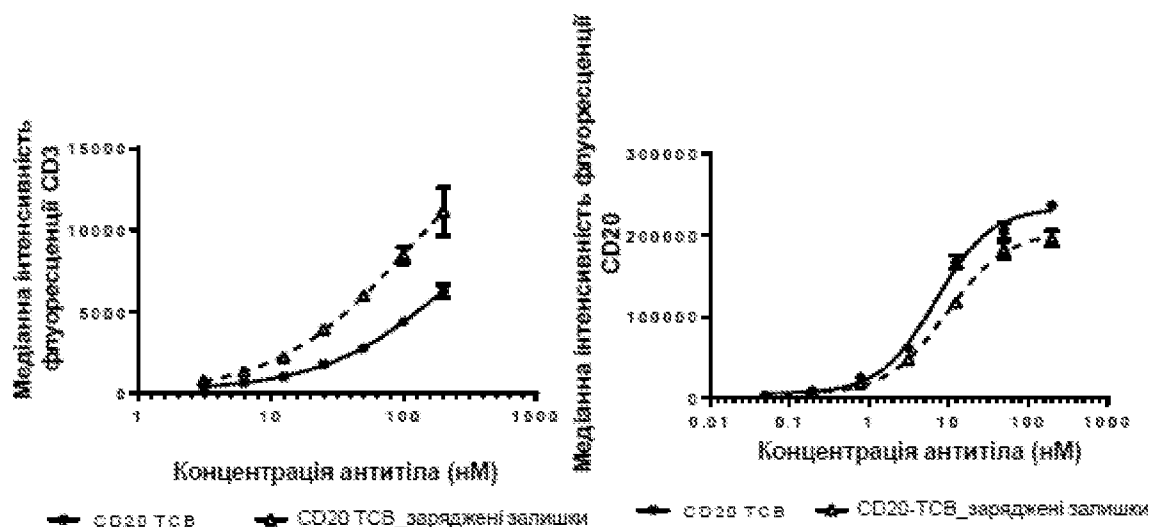
Фиг. 3

Л

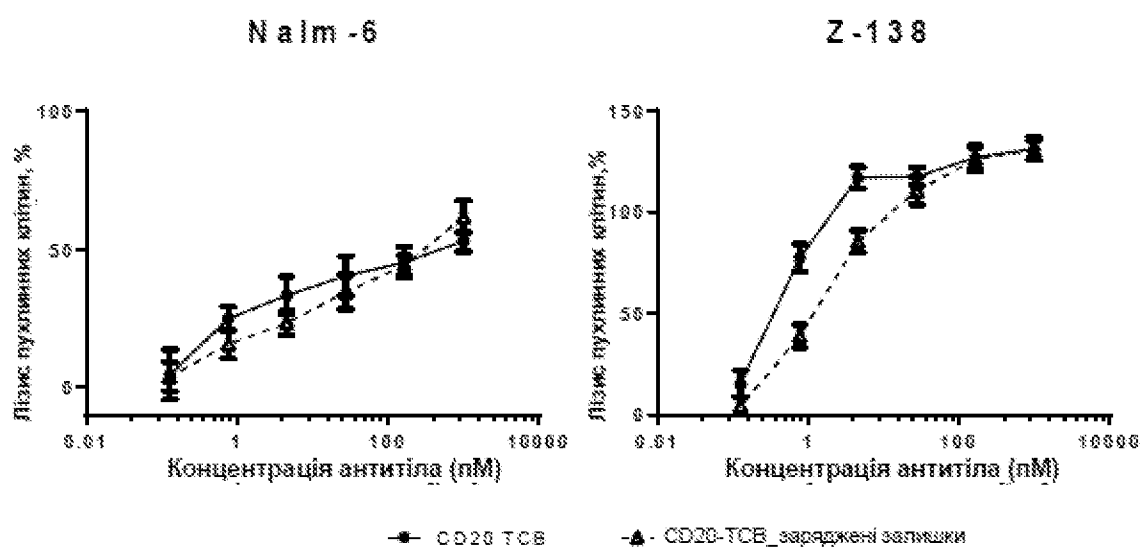
М



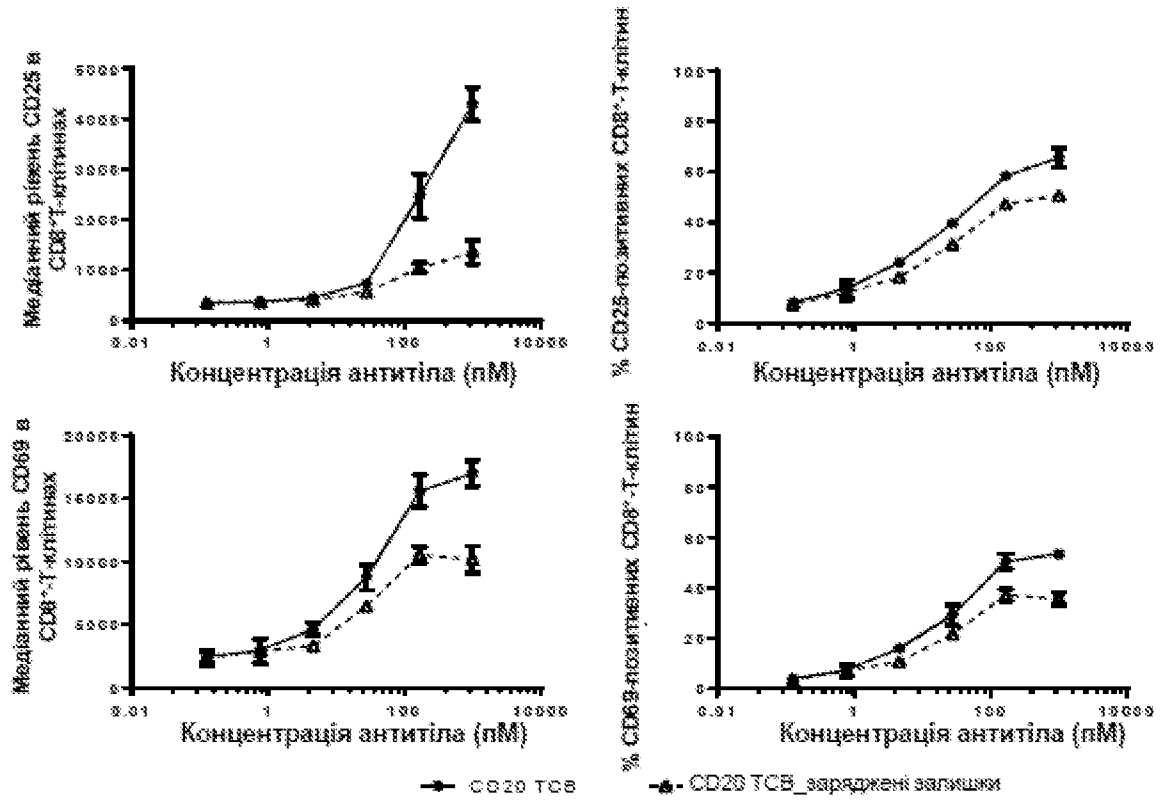
Фиг. 3



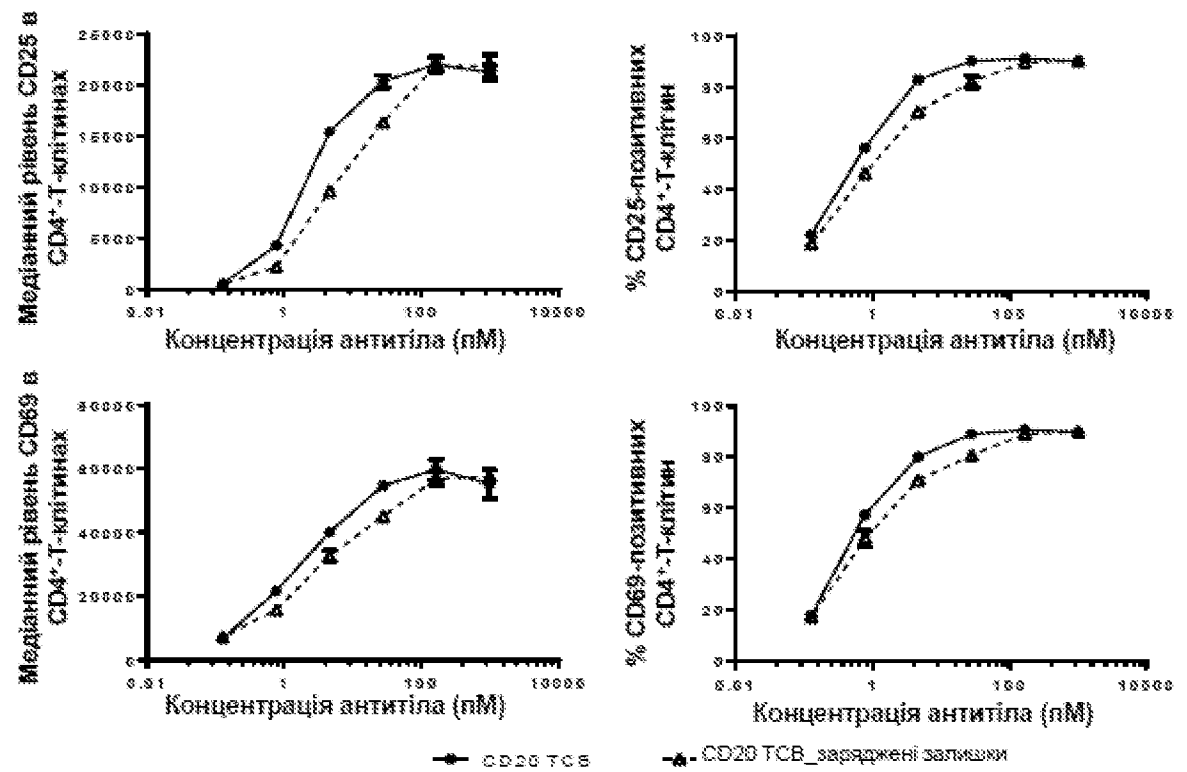
Фіг. 4



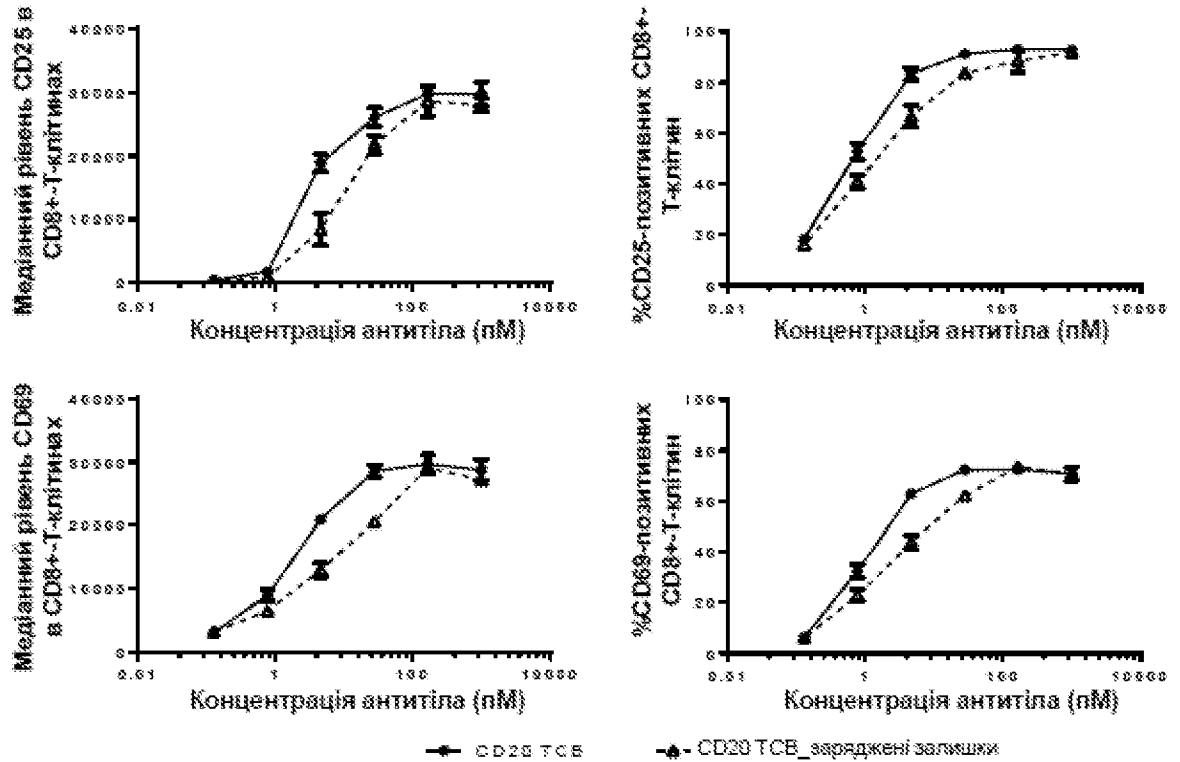
Фіг. 5



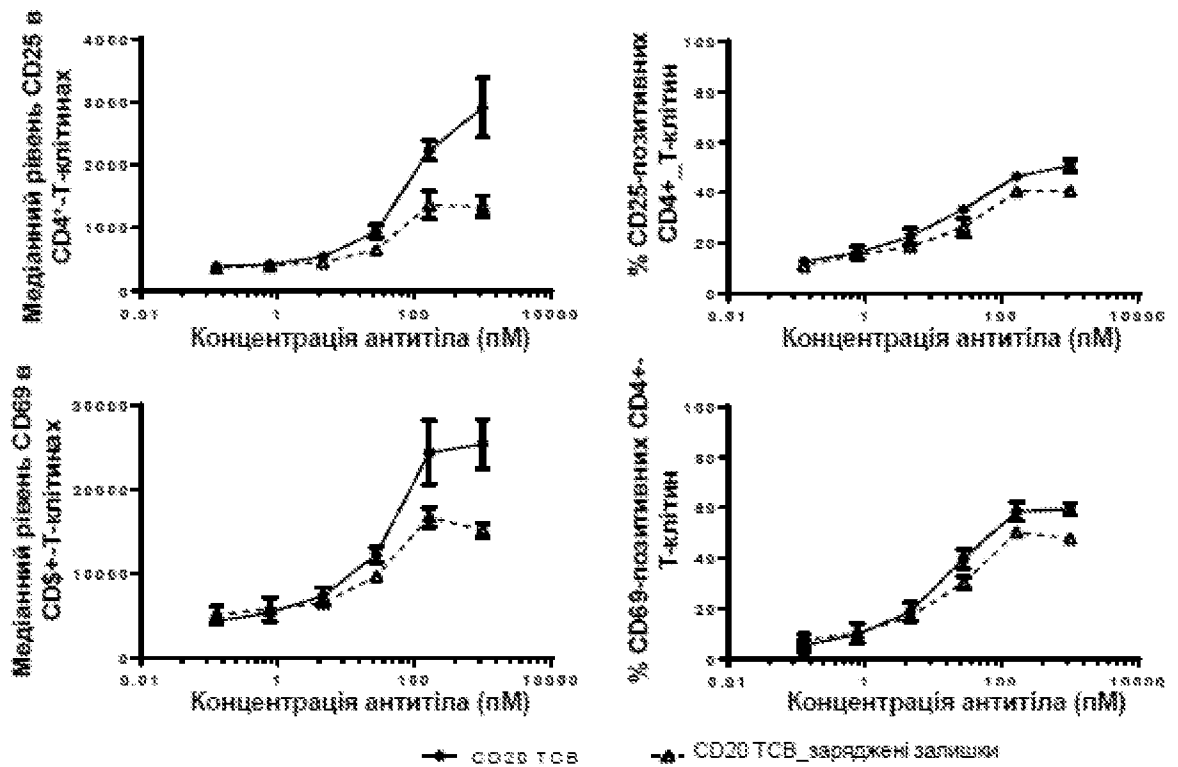
Фіг. 6А



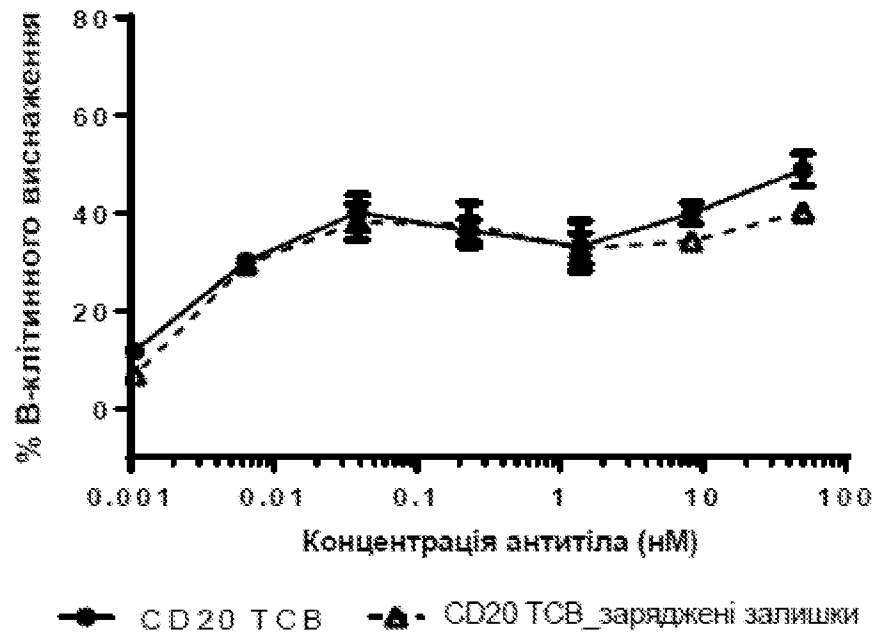
Фіг. 6Б



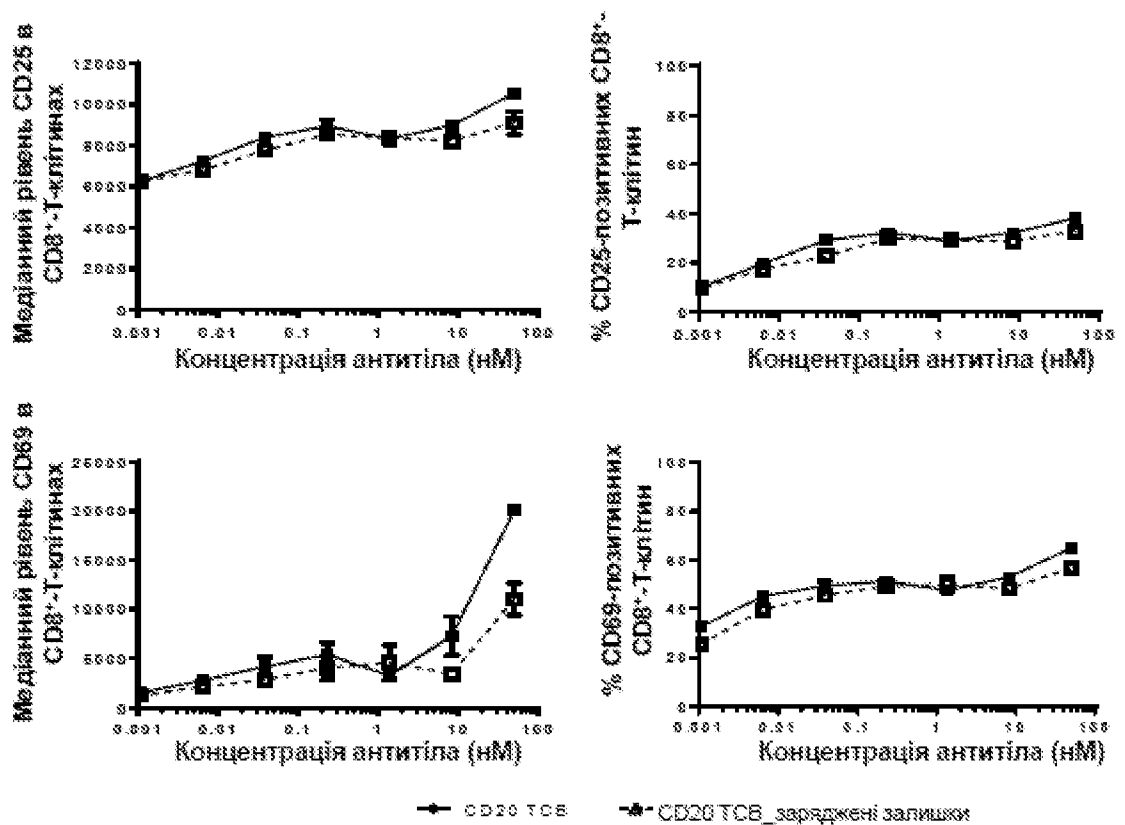
Фіг. 7А



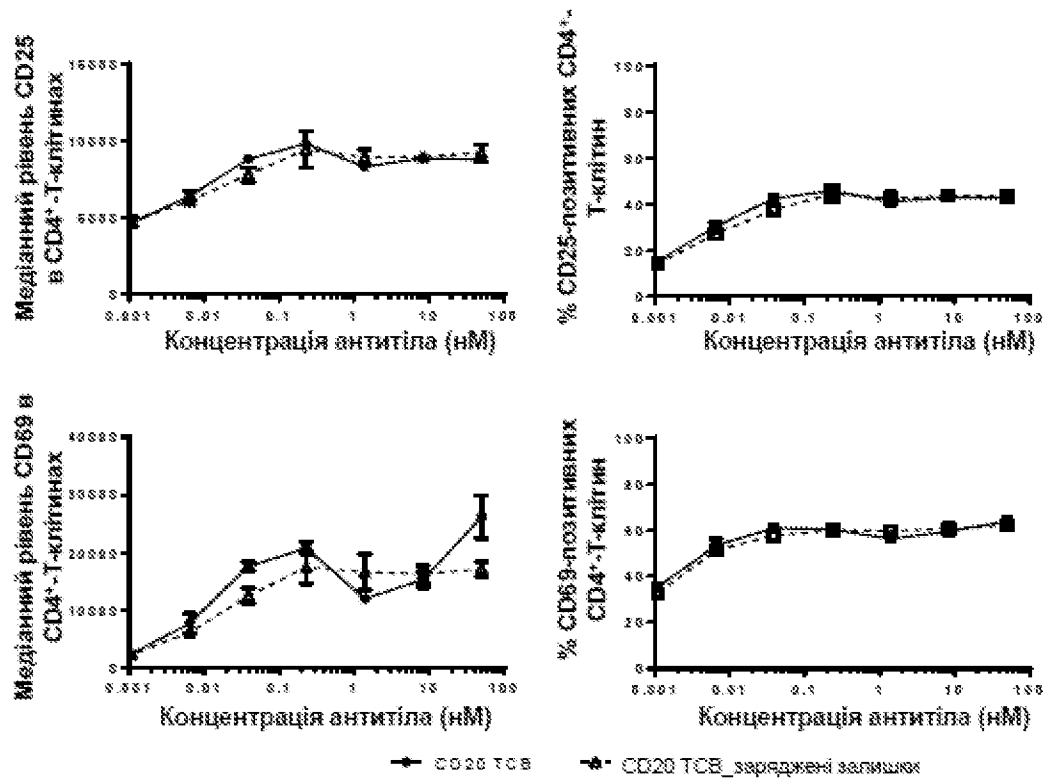
Фіг. 7Б



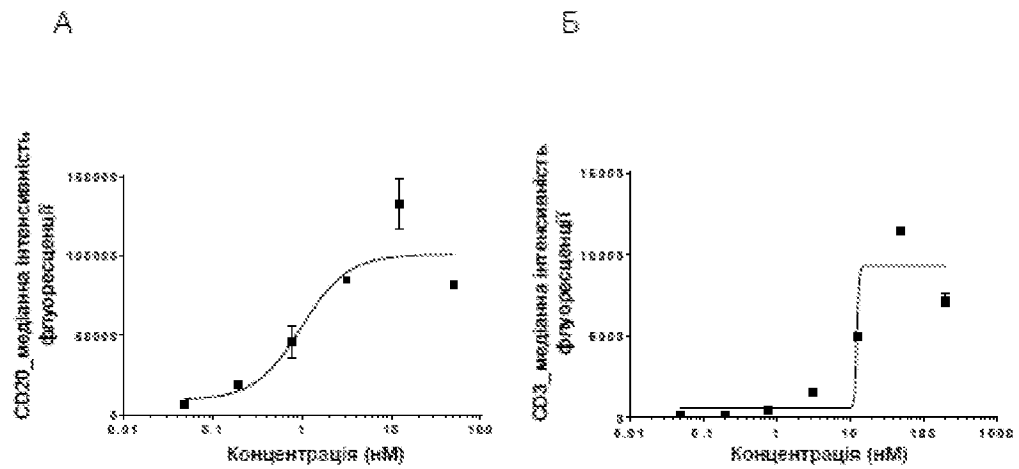
Фіг. 8



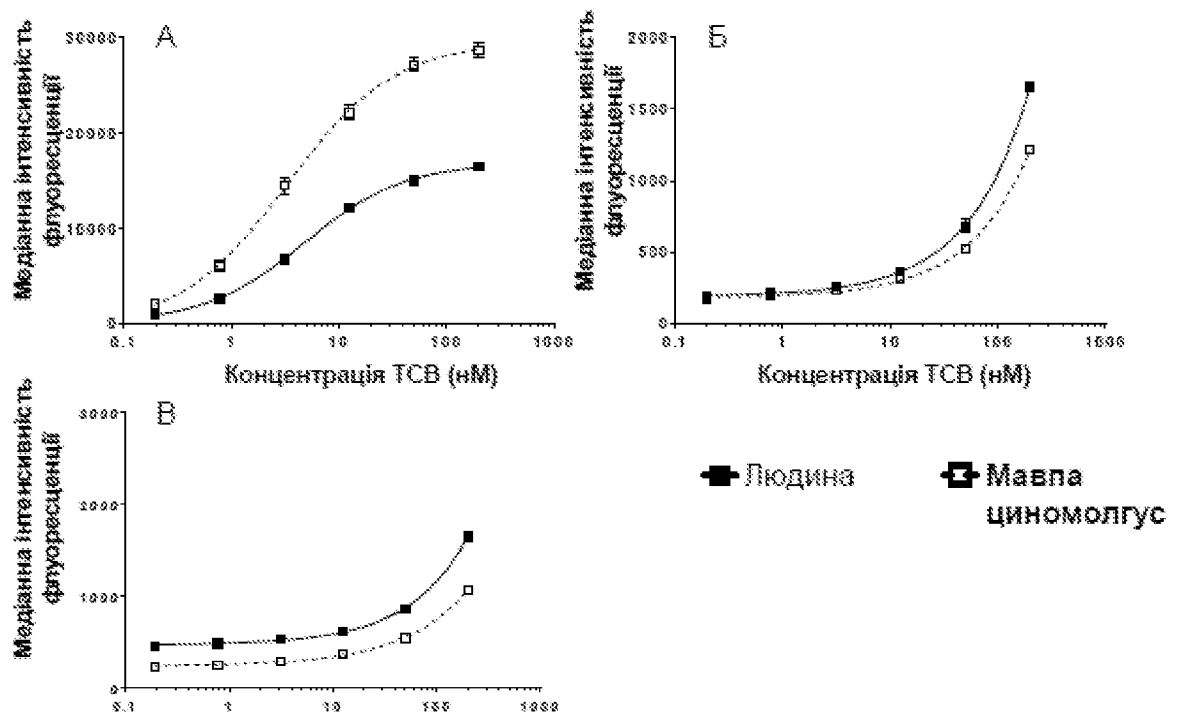
Фіг. 9А



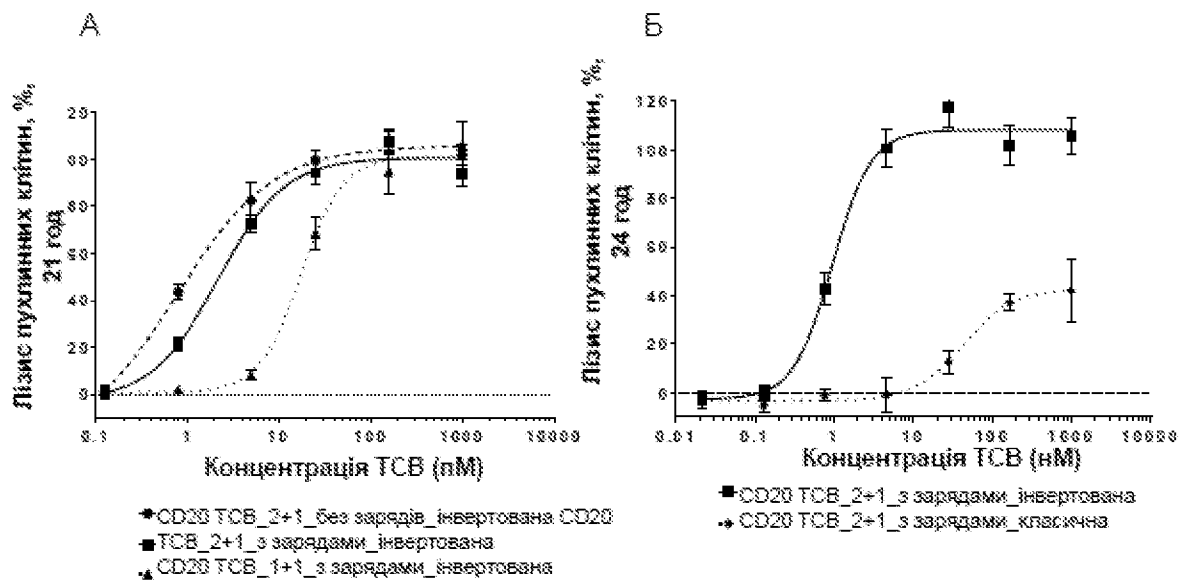
Фіг. 9Б



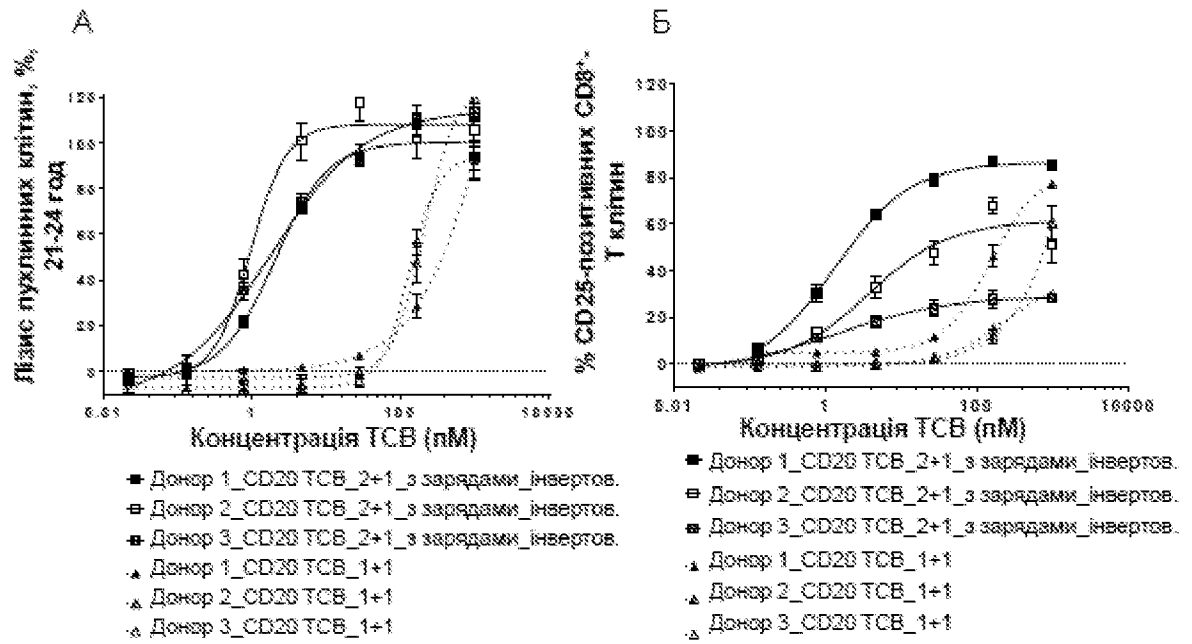
Фіг. 10



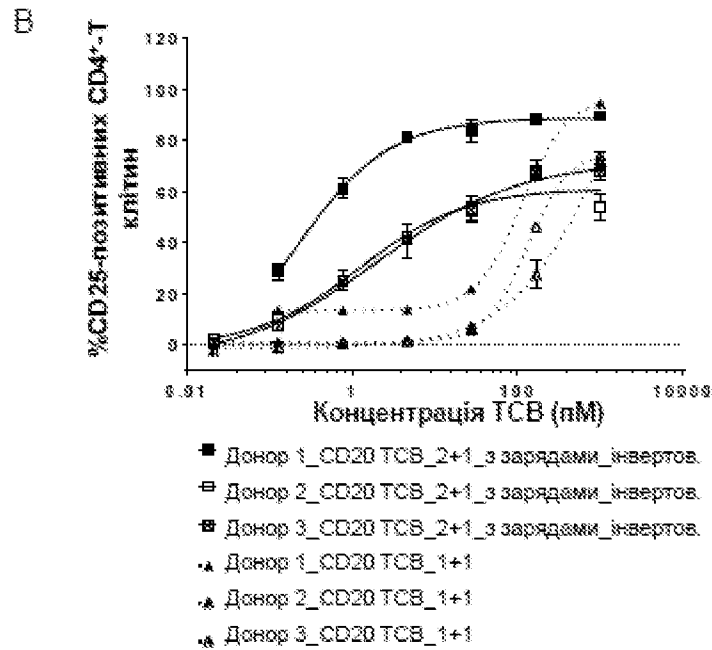
Фіг. 11



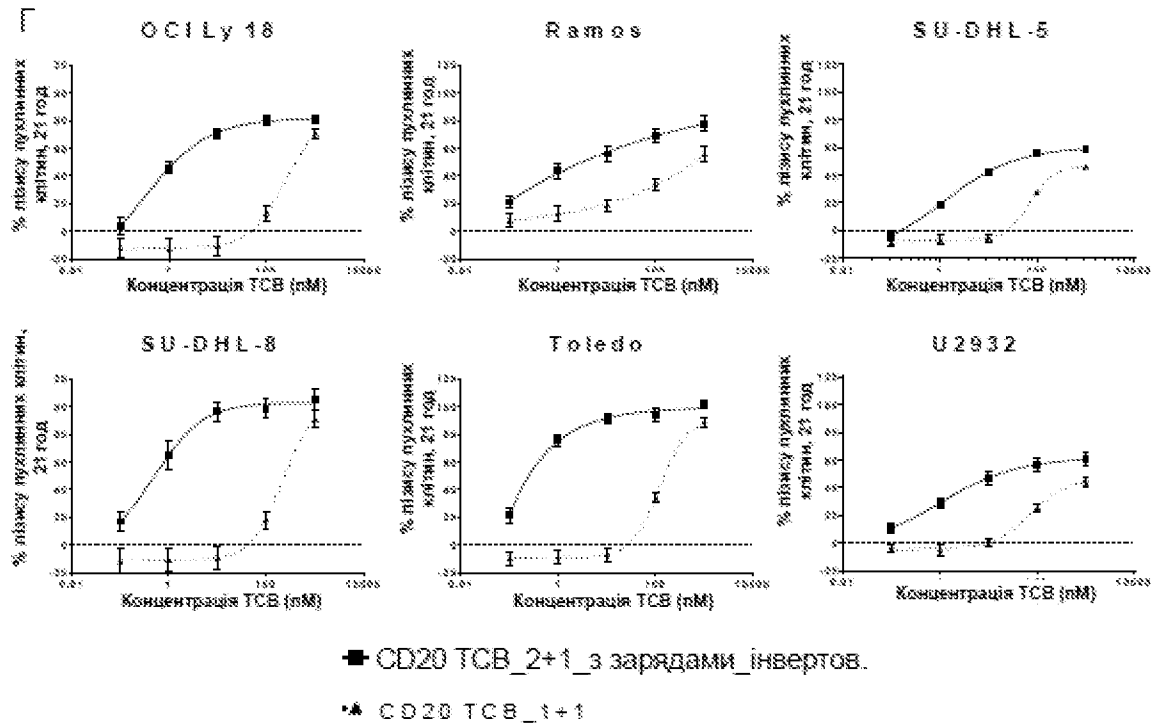
Фіг. 12



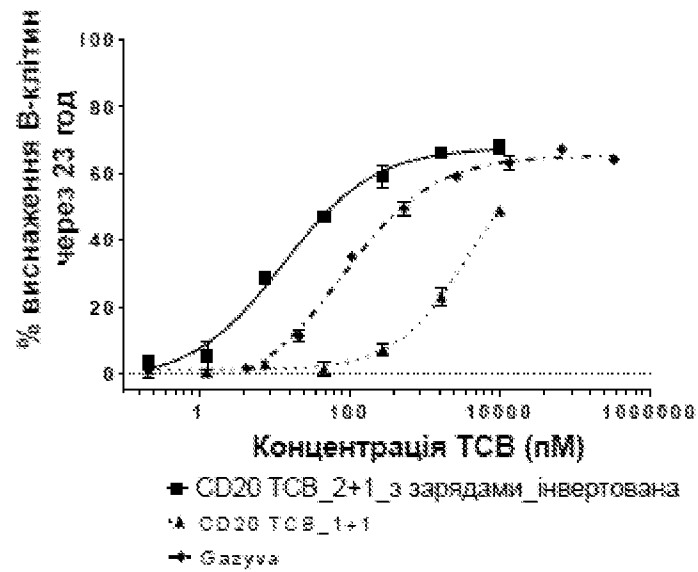
Фіг. 13



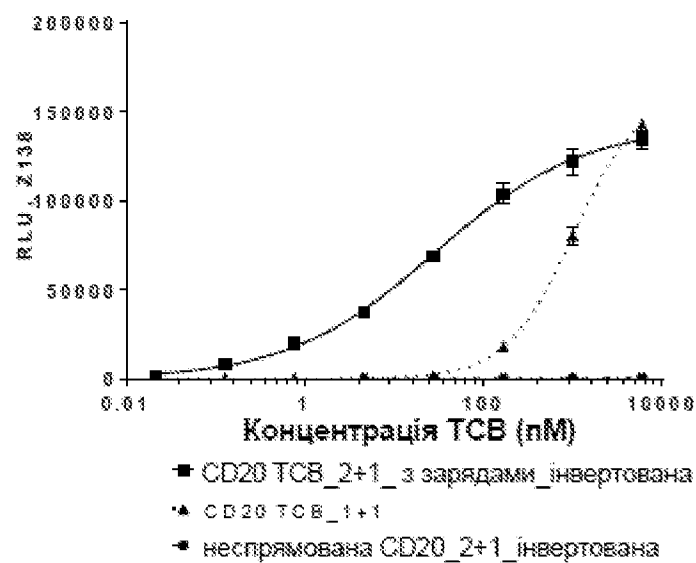
Фіг. 13



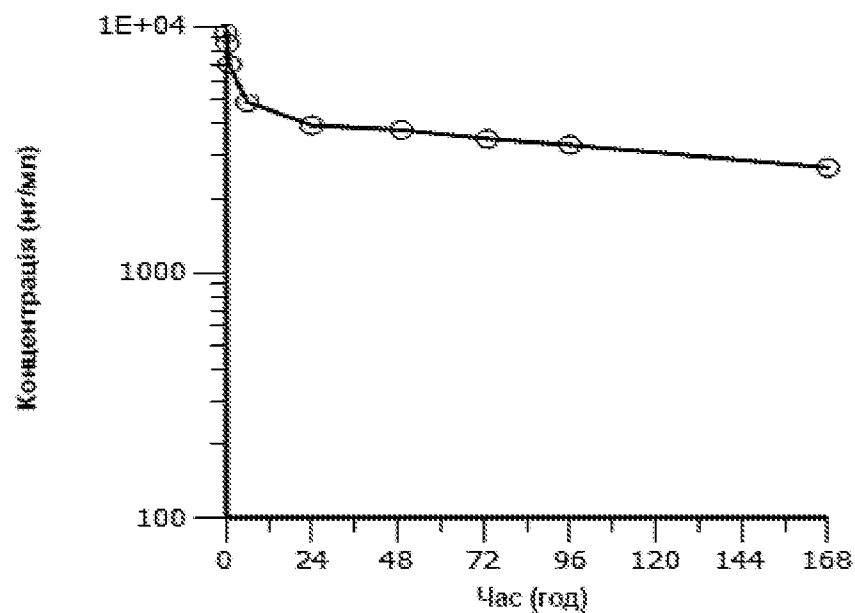
Фіг. 13



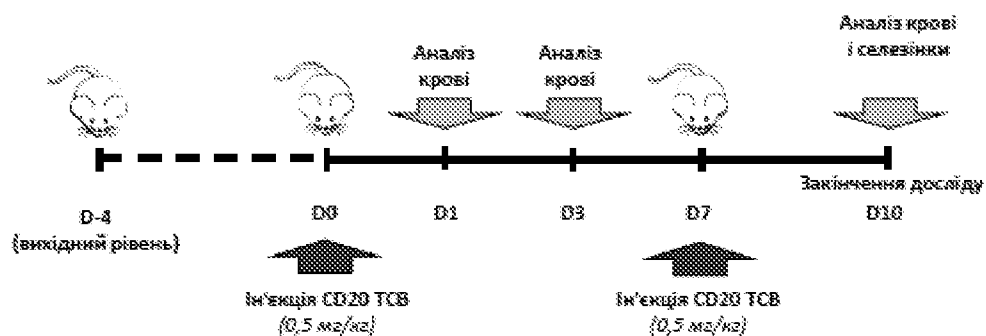
Фіг. 14



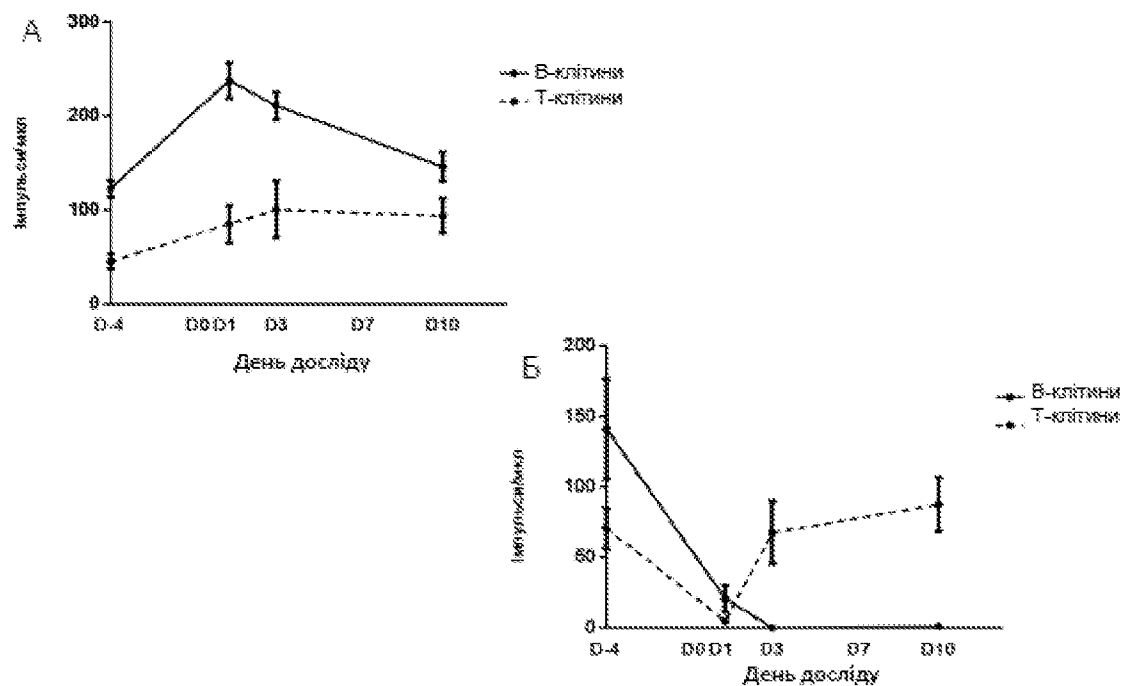
Фіг. 15



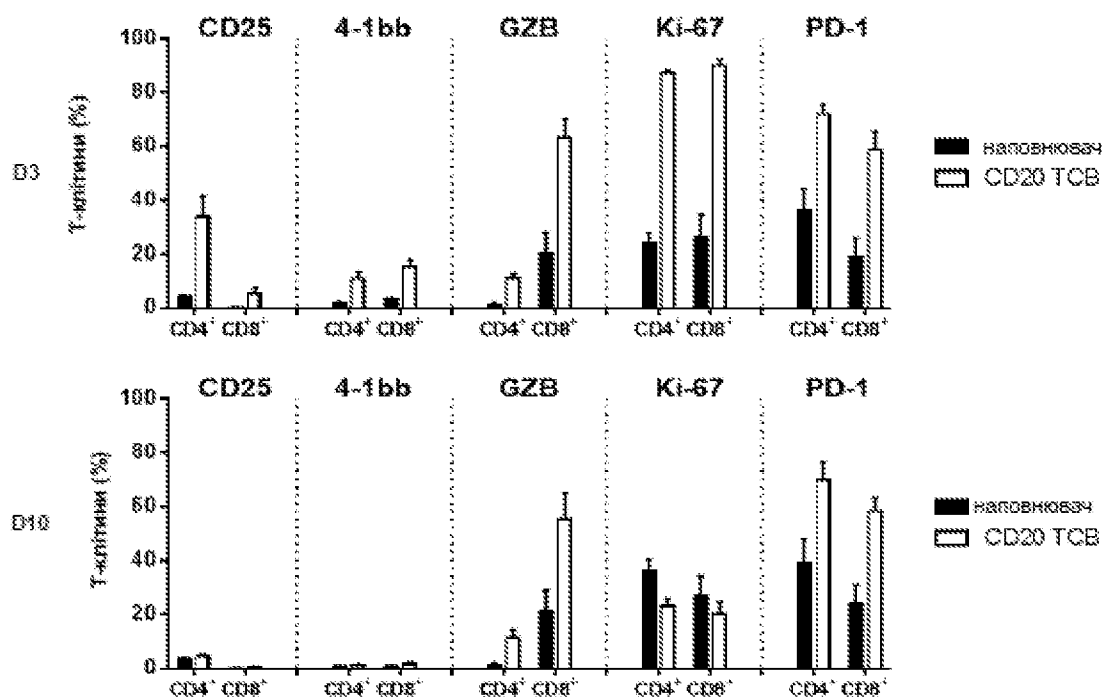
Фіг. 16



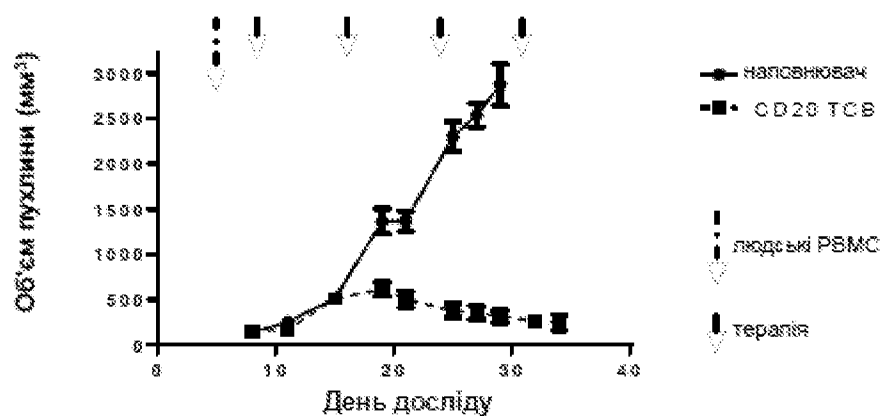
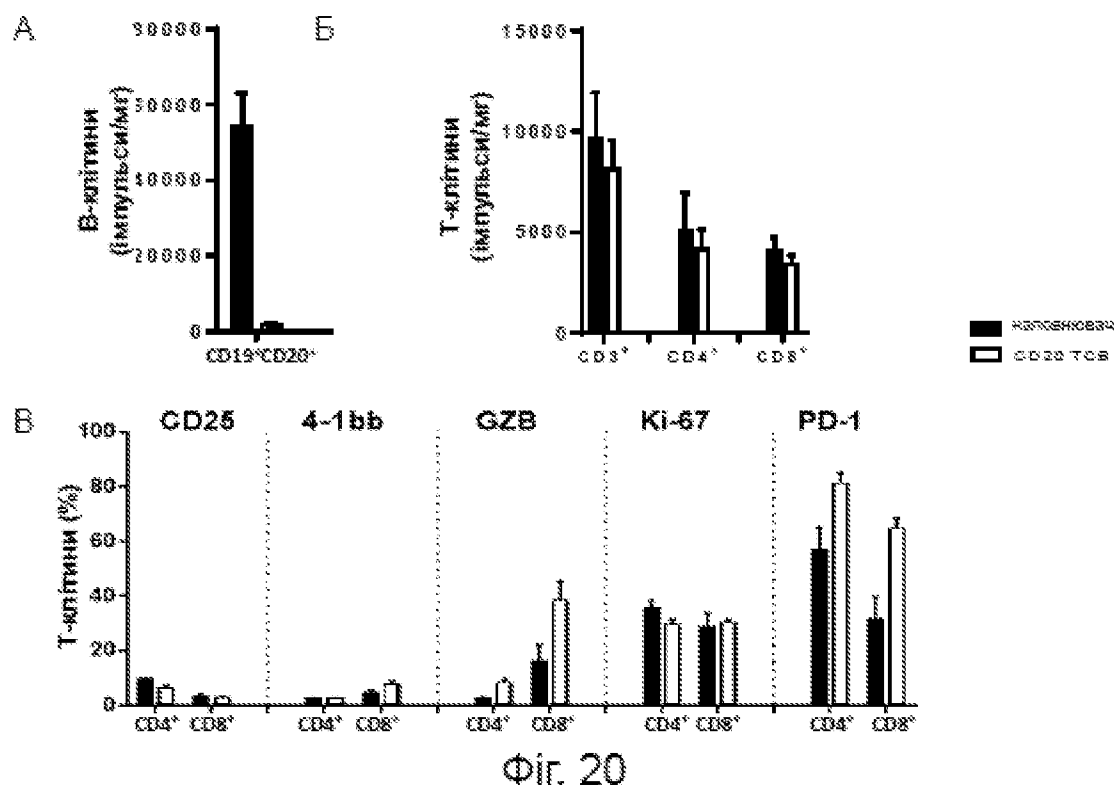
Фіг. 17

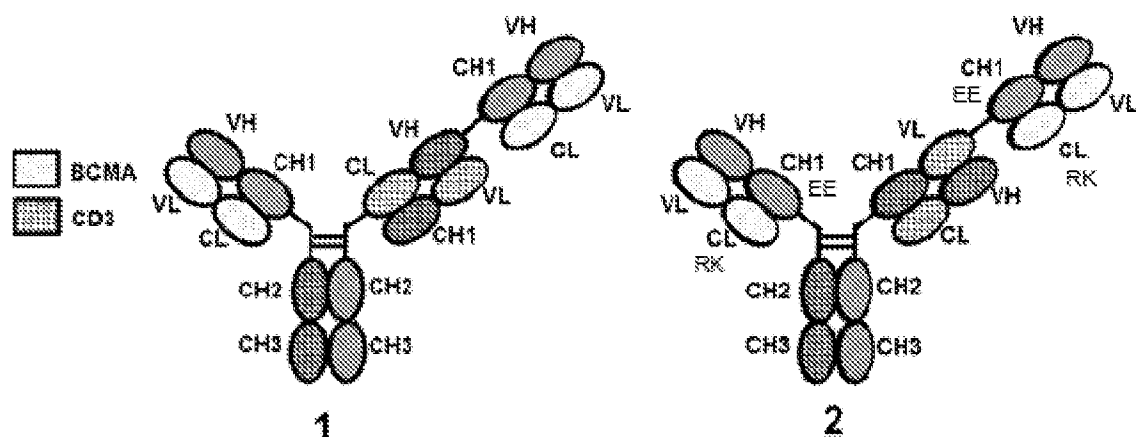


Фіг. 18



Фіг. 19





Фіг. 22

A. 83A10-TCB

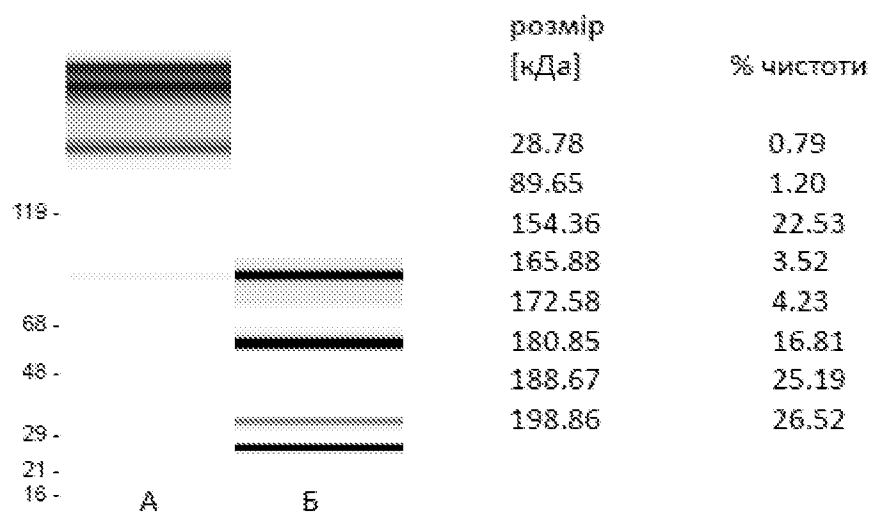
методи очищення: PA+SEC

чистота: <30%

вихід: 6,7 мг/л

кількість: 2,7 мг

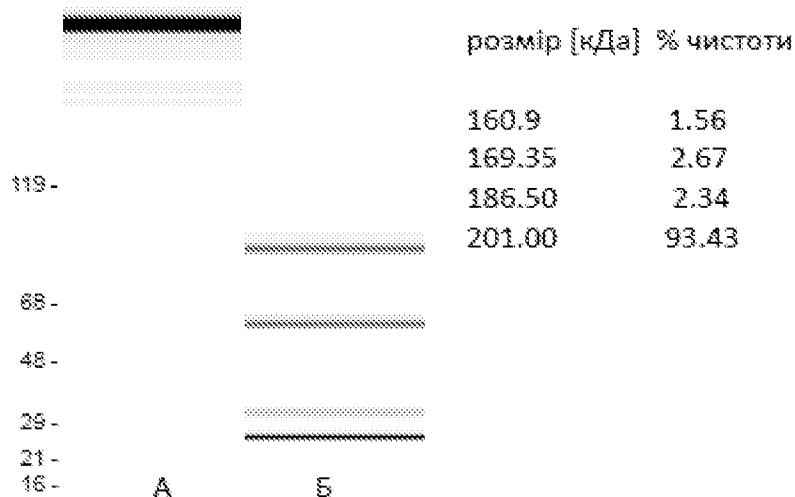
мономер: 82,8%



Фіг. 23

Б 83A10-TCB

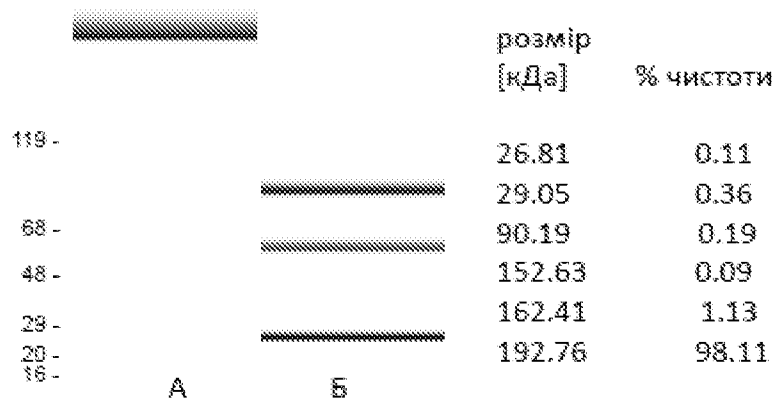
методи очистки: PA+SEC+ciEX+re-SEC
чистота: 93,4%
вихід: 0,42 мг/л
кількість: 0,168 мг
мономер: 82,8%



Фіг. 23

В 83A10-TCBcy

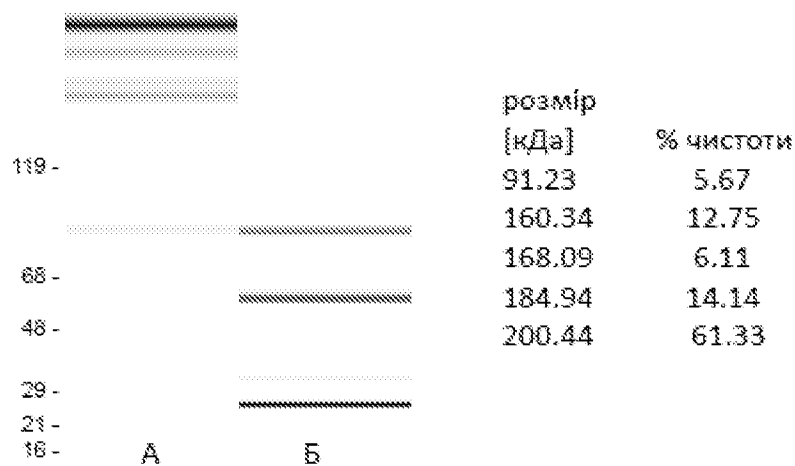
методи очистки: PA+SEC
чистота: 95,3%
вихід: 3,3 мг/л
кількість: 1,3 мг
мономер: 100%



Фіг. 23

A. 83A10-ICB

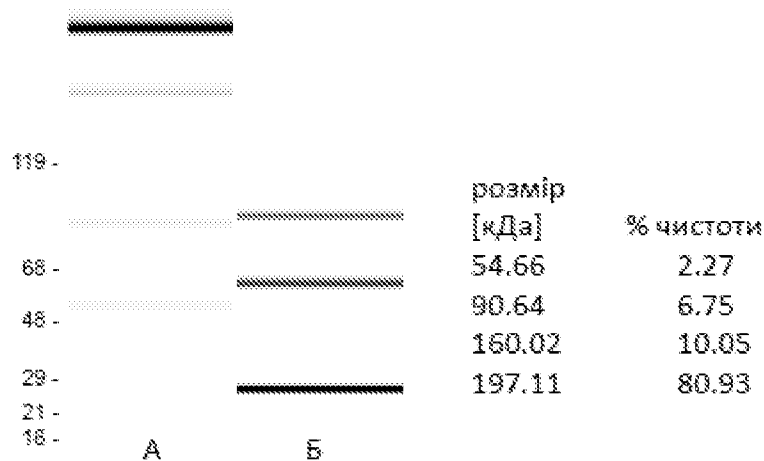
методи очистки: РА
 чистота: 61,3%
 вихід: 26,2 мг/л
 кількість: 24,3 мг
 мономер: 63,7%
 РХ-МС: n.d.



Фіг. 24

Б 83A10-ICBcy

методи очистки: РА
 чистота: 81,0%
 вихід: 51,5 мг/л
 кількість: 50,2 мг
 мономер: 68,2%
 РХ-МС: n.d.



Фіг. 24

В ВЗА10-TCB

методи очистки: PA+SEC

чистота: 69,5%

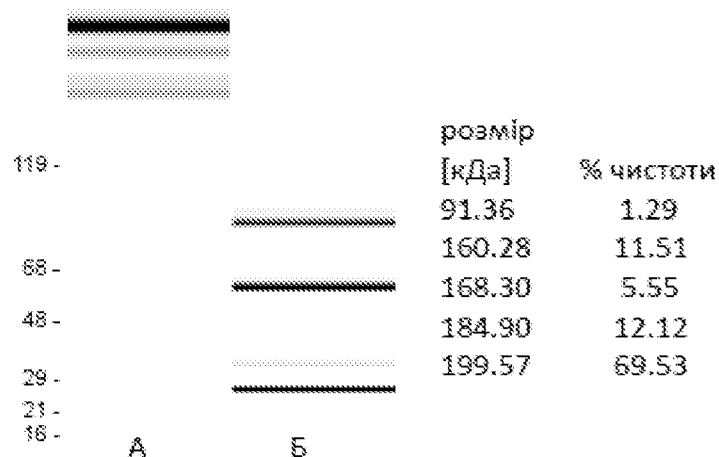
вихід: 14,1 мг/л

кількість: 13,1 мг

мономер: 74,7%

PX-МС: 40-60%

«правильних» молекул



Фіг. 24

Г ВЗА10-TCBcy

методи очистки: PA+SEC

чистота: 91,0%

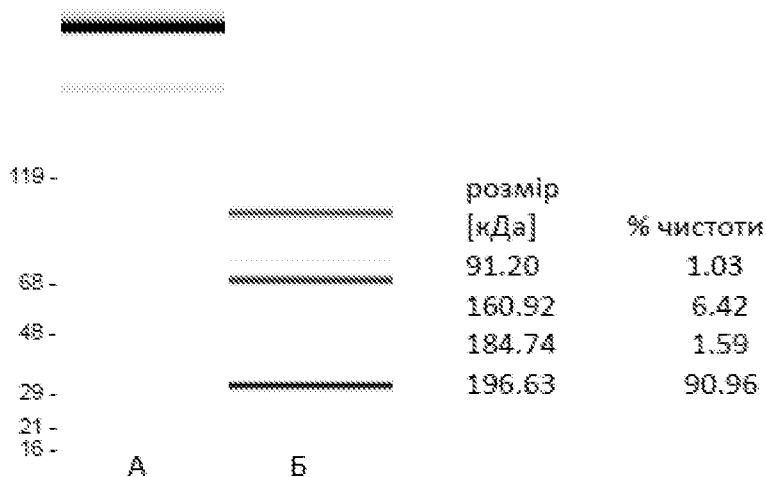
вихід: 10,3 мг/л

кількість: 10,0 мг

мономер: 83,9%

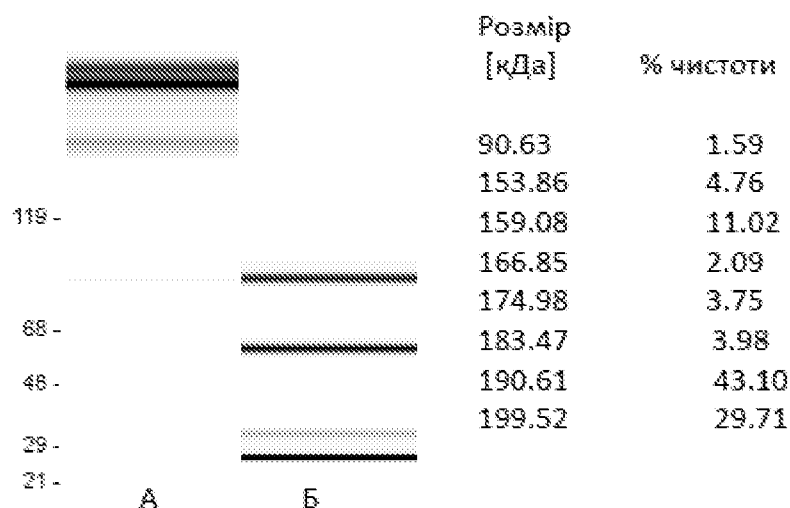
PX-МС: 90%

«правильних» молекул



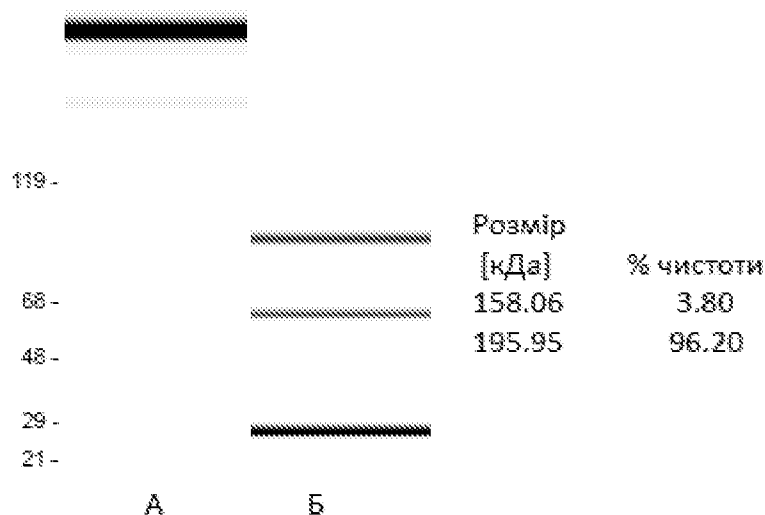
Фіг. 24

Г 83A10-TCB
методи очистки:
[(PA+SEC)+(PA)]+cIEX+SEC
чистота: 43,1%
вихід: 0,43 мг/л
кількість: 0,73 мг
мономер: 98,3%
PX-МС: 60-70%
«правильних»
молекул

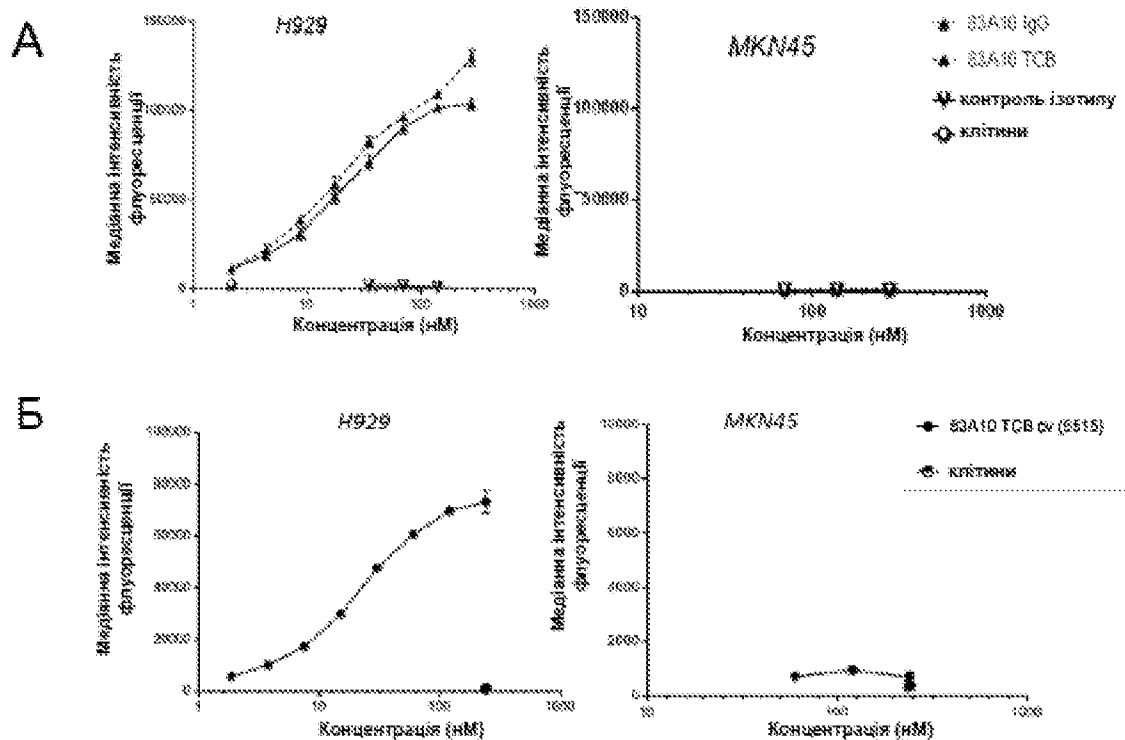


Фіг. 24

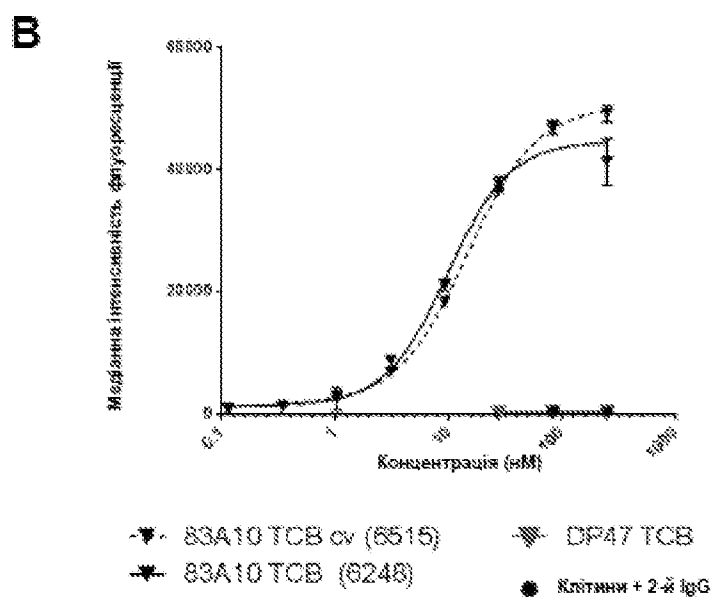
Д 83A10-TCBcv
методи очистки:
[(PA+SEC)+(PA)]+cIEX+SEC
чистота: 96,2%
вихід: 0,64 мг/л
кількість: 1,27 мг
мономер: 98,9%
PX-МС: >95%
«правильних» молекул



Фіг. 24

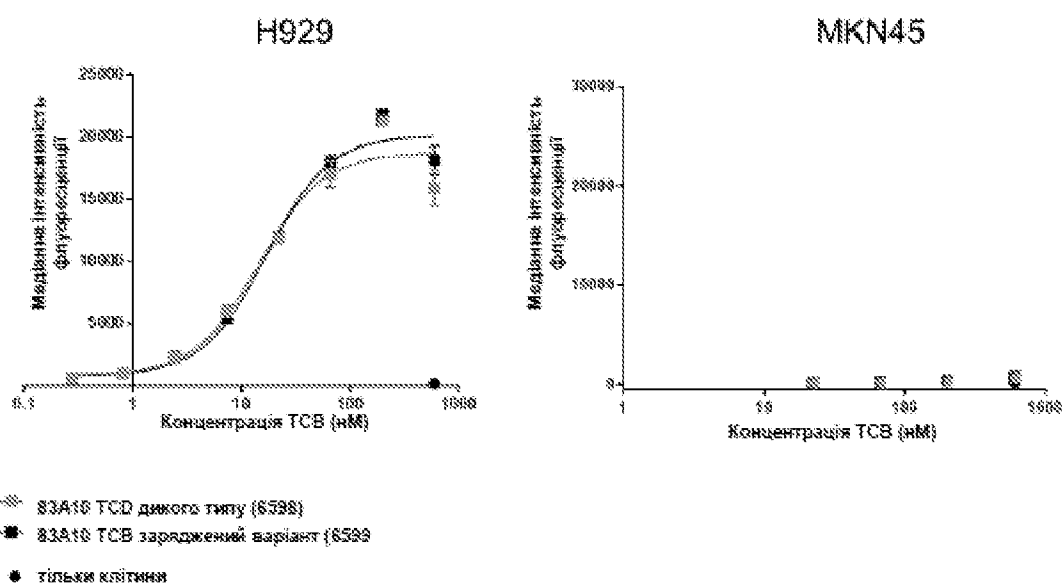


Фіг. 25

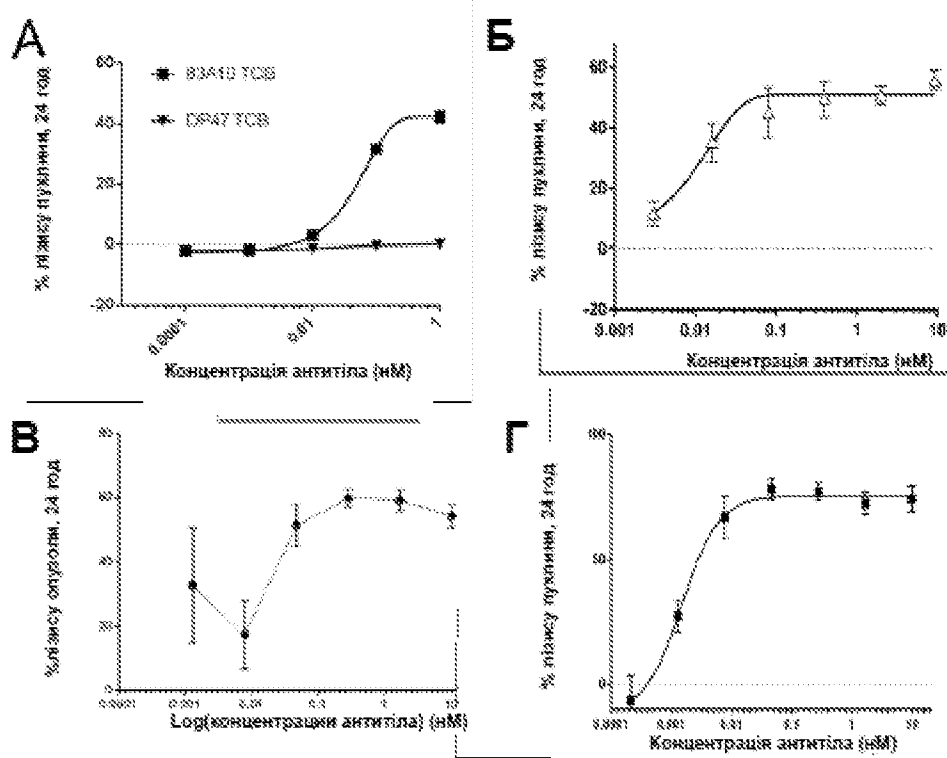


Фіг. 25

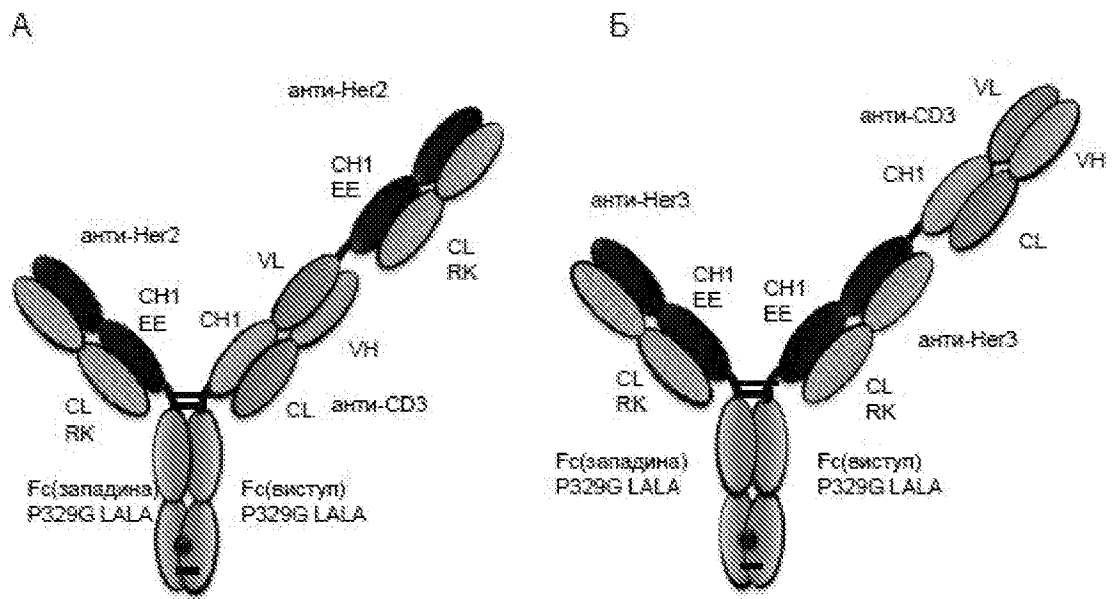
Г



Фіг. 25

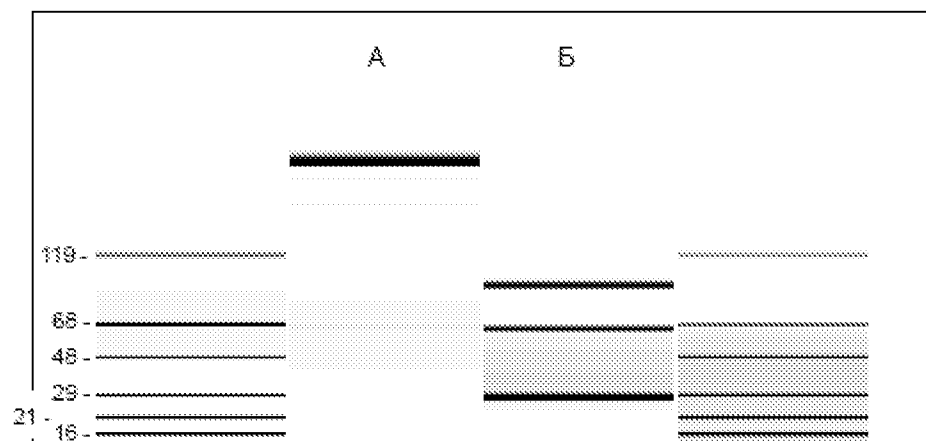


Фіг. 26



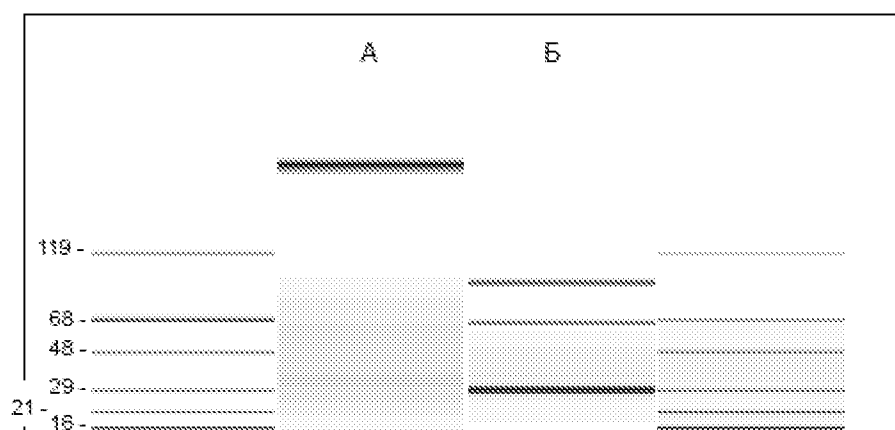
Фиг. 27

А

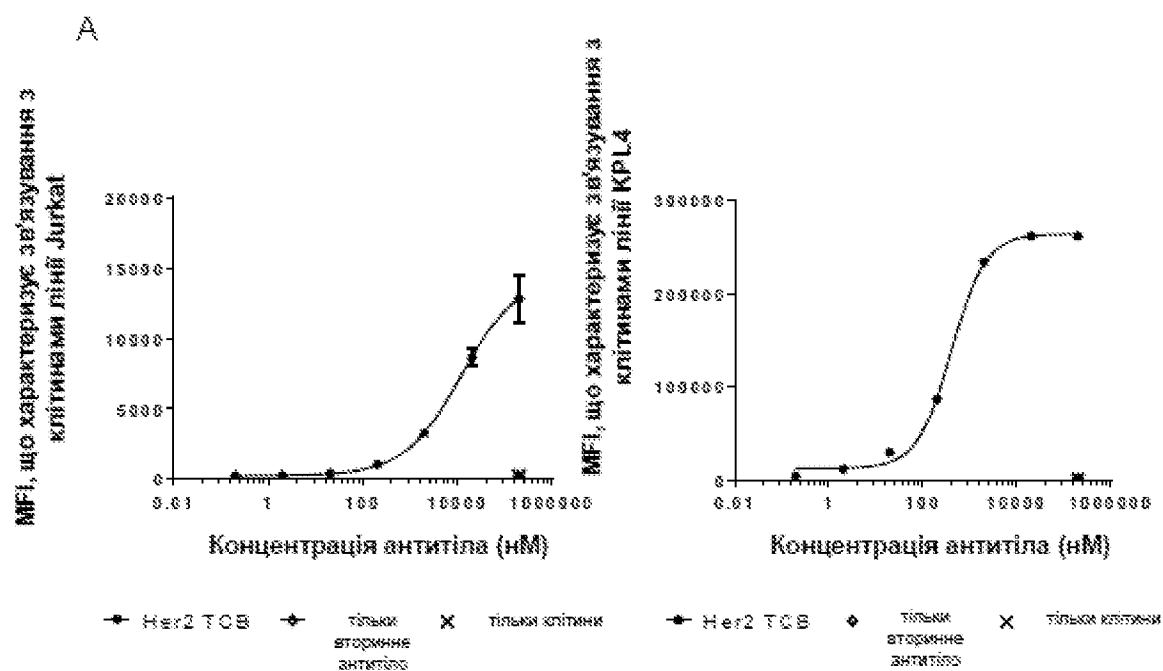


Фиг. 28

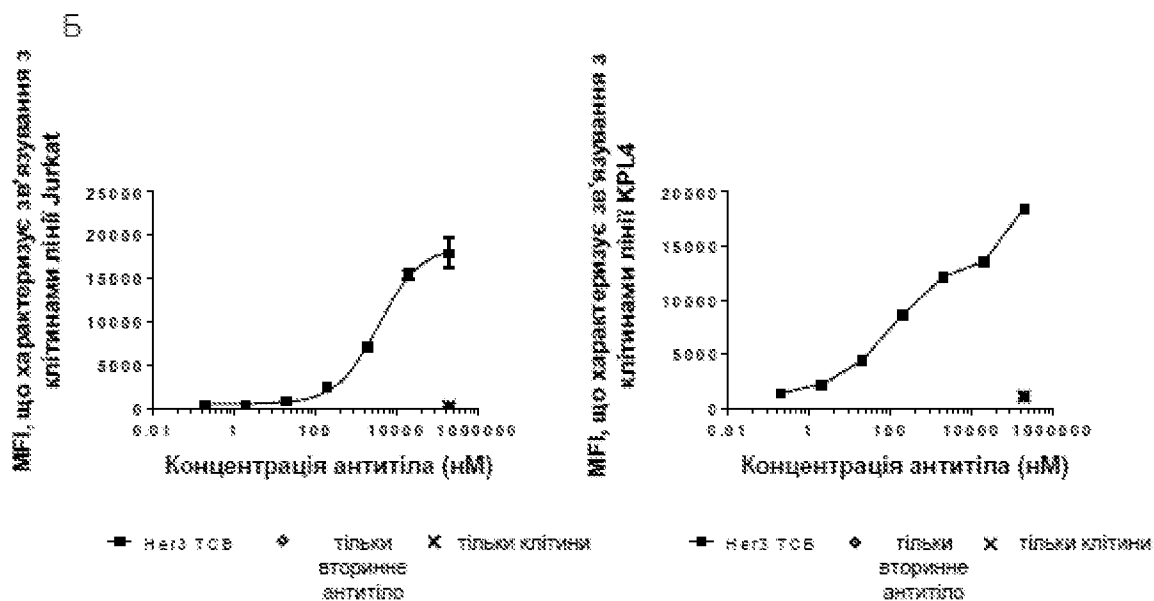
Б



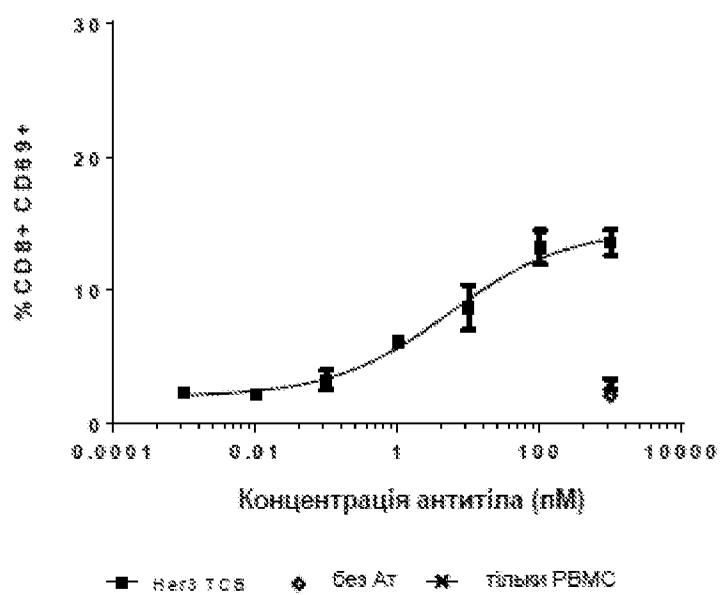
Фіг. 28



Фіг. 29

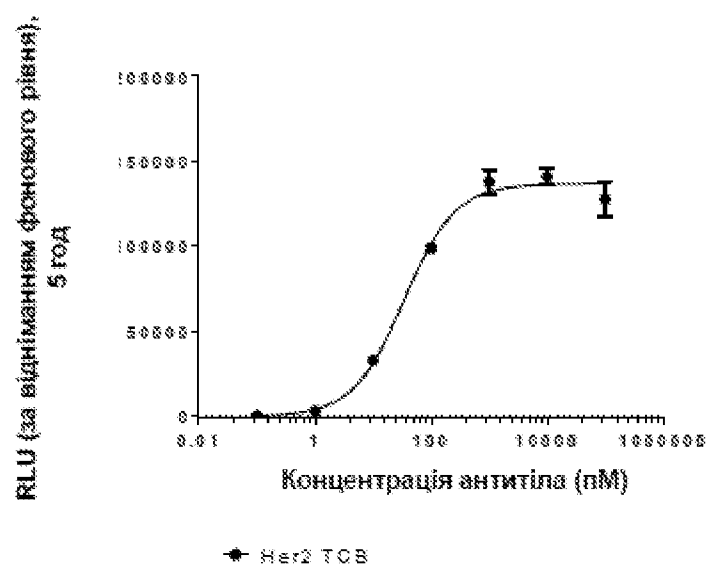


Фіг. 29



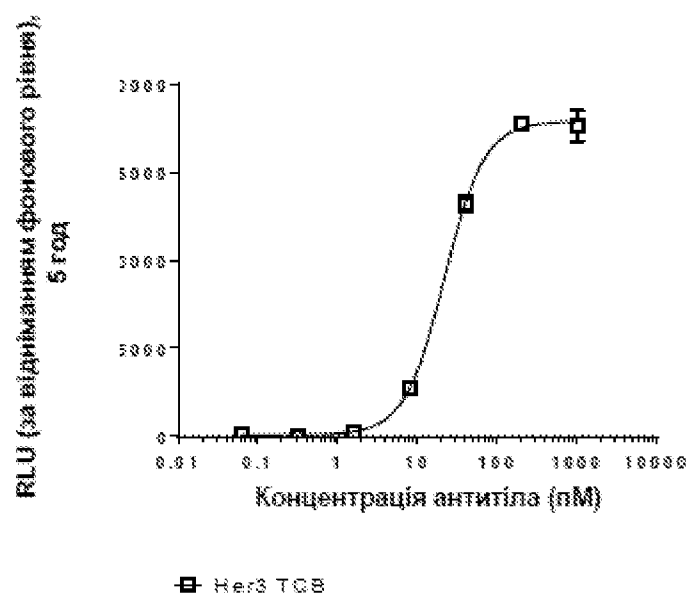
Фіг. 30

А

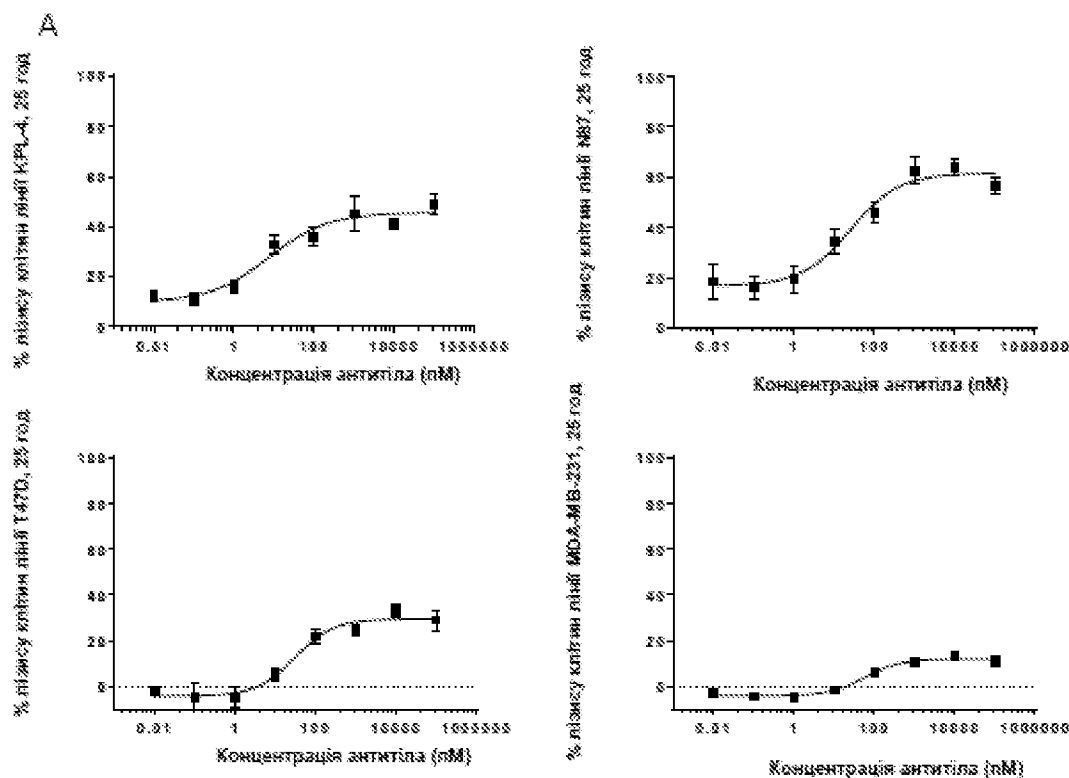


Фіг. 31

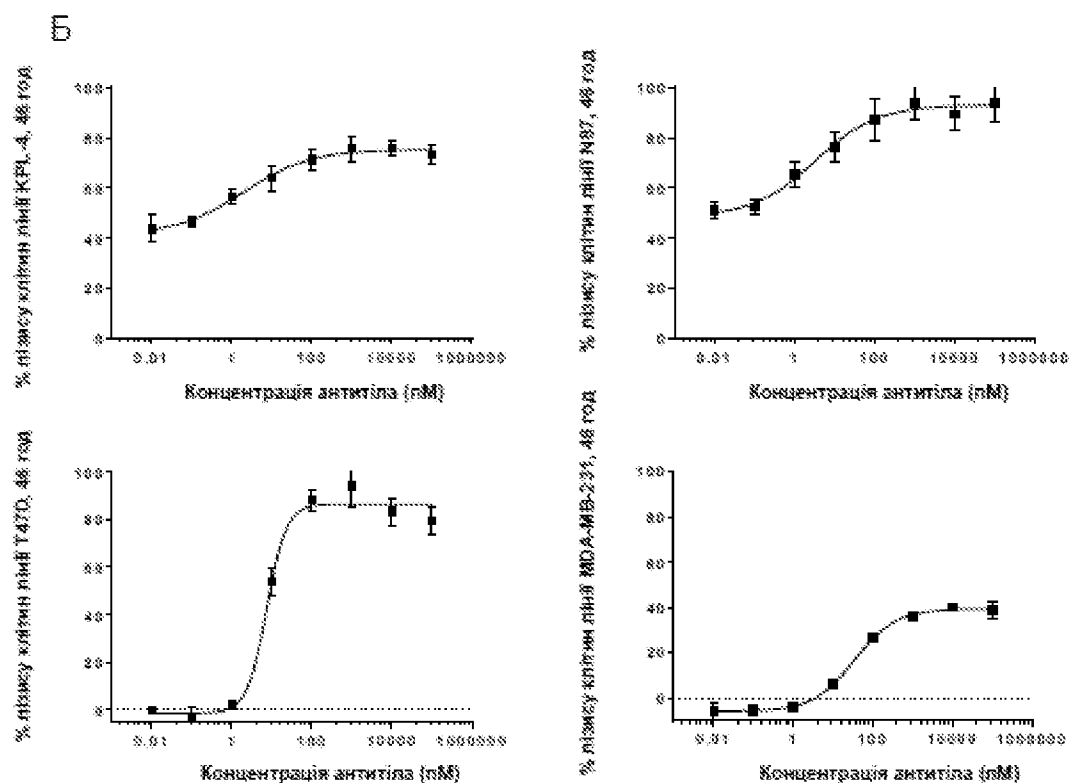
Б



Фіг. 31

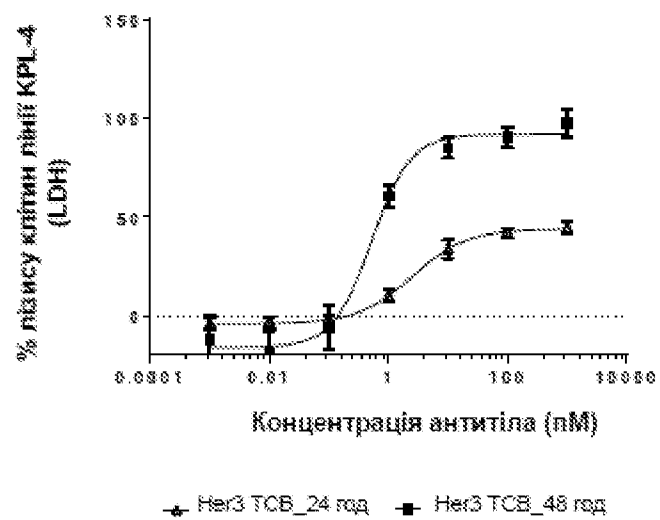


Фіг. 32

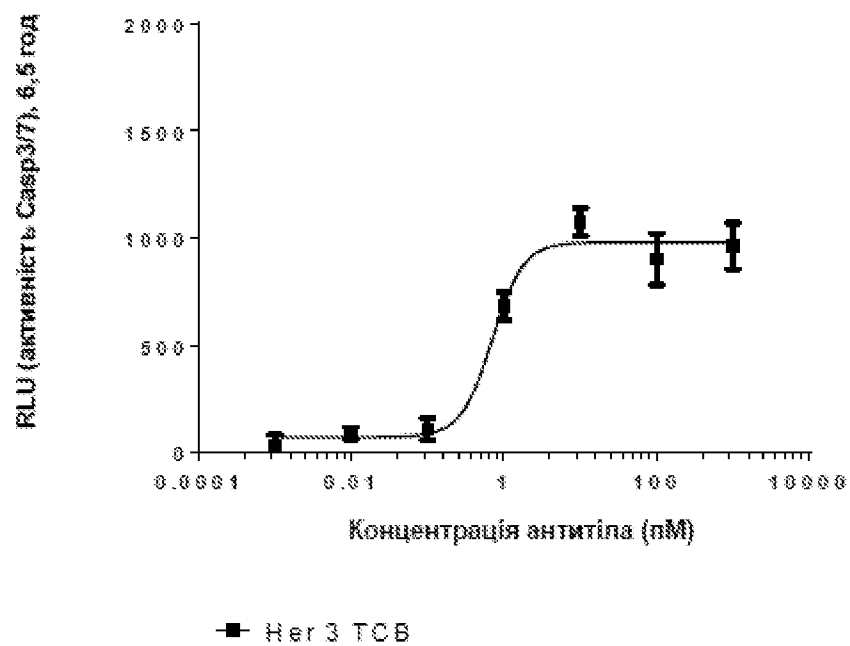


Фіг. 32

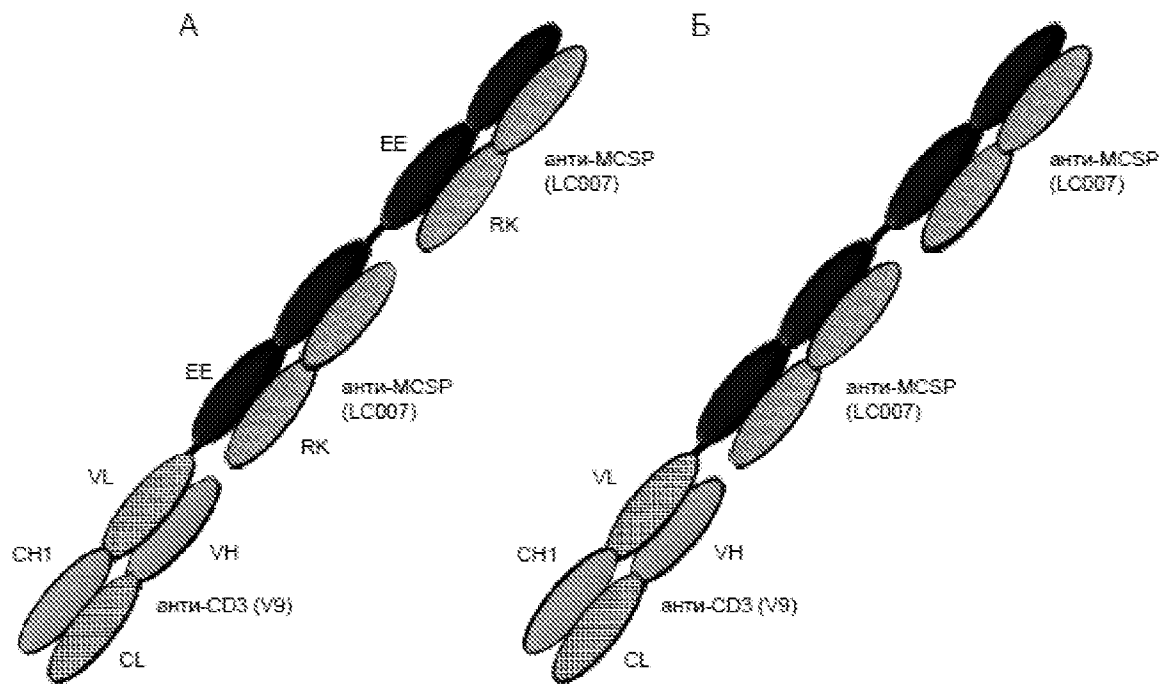
В



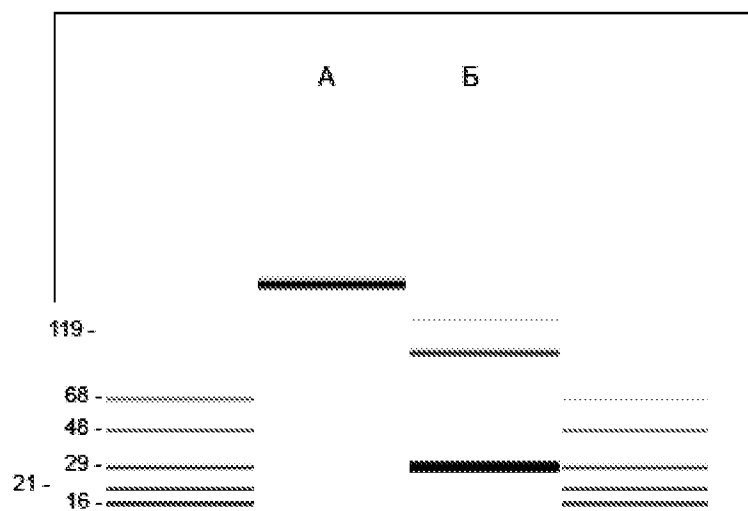
Фіг. 32



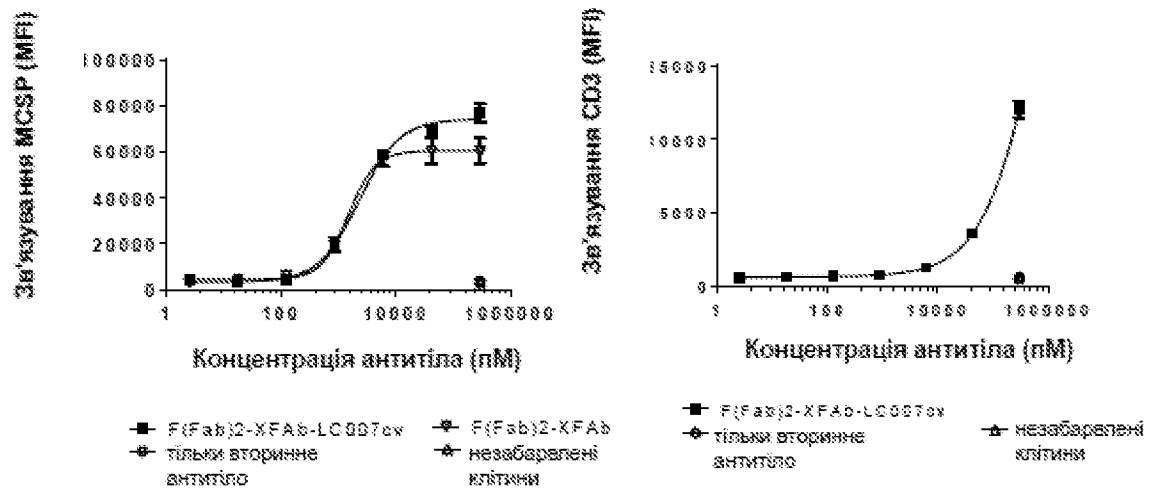
Фіг. 33



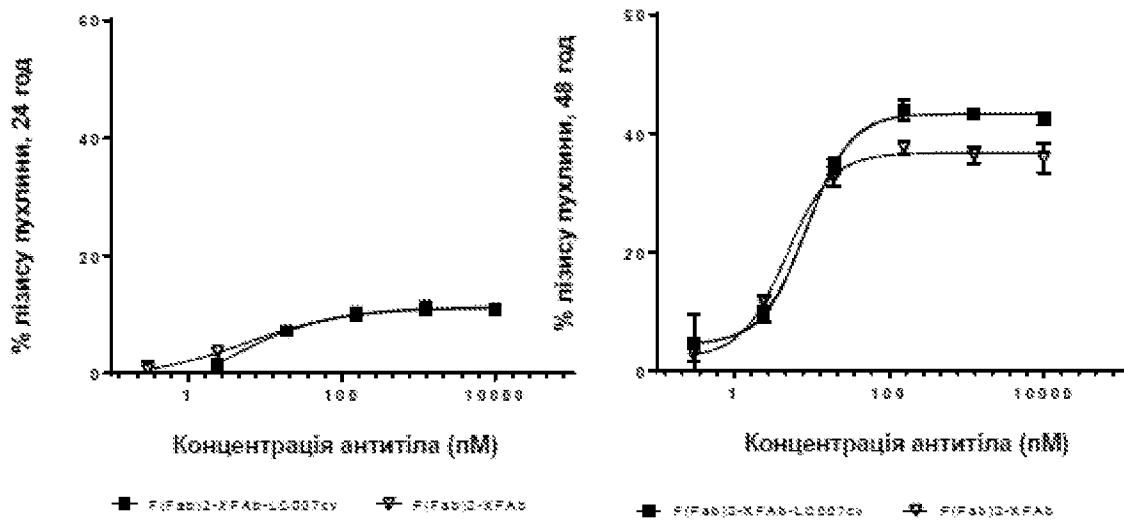
Фиг. 34



Фиг. 35



Фіг. 36



Фіг. 37